D. x1

19/2

22101733834

Med
K8084

Digitized by the Internet Archive
in 2016

https://archive.org/details/b28110286

Leitfaden

für

histiologische Untersuchungen.

Von

Dr. Bernhard Rawitz,
Privatdozenten an der Universität Berlin.

Zweite umgearbeitete und vermehrte Auflage.

Jena.
Verlag von Gustav Fischer.
1895.

14 778 601

WELLCOME INSTITUTE LIBRARY
Coll. welMOmec
Call No. QS

Vorwort zur II. Auflage.

Die zweite Auflage meines Leitfadens wird hoffentlich nicht blofs eine vermehrte, sondern auch eine verbesserte sein.

Eine Vermehrung hat sie erfahren, indem der erste Abschnitt jetzt elf Kapitel hat, während er früher nur sieben besafs. Kap. I. IV. VIII und XI sind neu hinzugekommen. Diese Vermehrung dürfte wohl eine Verbesserung bedeuten, weil sie eine übersichtlichere Einteilung des Stoffes herbeiführt. Besondere Sorgfalt habe ich dem Kapitel der Färbungen gewidmet. Hier, wie auch in den anderen Kapiteln, habe ich einzelne Methoden eliminiert, die meiner Ansicht nach die Prüfung nicht bestanden haben, und manche neue aufgenommen, die erst einer genauen Prüfung zu unterziehen sind. Aber vor allen Dingen habe ich beim Kapitel der Färbungen eine ganz neue bisher nirgends angewandte Einteilung, in substantive und adjektive Färbung, vorgenommen, die mir nötig schien, um klar zu machen, was wir bei der Färbung mikroskopischer Präparate eigentlich thun. Veranlafst wurde ich zu diesem Vorgehen durch ein eingehendes Studium der Lehrbücher der industriellen Färbetechnik. Der Anhang zu Kapitel III des I. Abschnittes, der die Synonyma der Anilinfarbstoffe enthält, wird hoffentlich nicht zwecklos sein und die Möglichkeit gewähren, neu empfohlene Farbstoffe daraufhin zu prüfen, ob sie wirklich neu sind oder ob es sich nur um eine neue Nüance handelt.

Eine völlige Umarbeitung und bedeutende Erweiterung hat der II. Abschnitt erfahren. Ich wünschte, er wäre in dieser Gestalt auch für den Anfänger brauchbar und bildete so eine Ergänzung zu meinem „Grundrifs der Histologie“ (Berlin 1894). Dafs er in erster Linie auf die Histologie der Vertebraten Rücksicht nimmt, ist ohne weiteres verständlich. Die Methoden sind aber auch für Evertebraten sinngemäfs verwendbar; an einzelnen Stellen habe ich der Wirbellosen noch

besonders gedacht. Anraten möchte ich dem Anfänger, nicht blofs die Beschreibung der Methoden zu lesen, sondern sich auch die in den allgemeinen Bemerkungen bei den einzelnen Kapiteln des ersten Abschnittes gegebenen Regeln einzuprägen; er wird dann sicherer und mit grösserer Aussicht auf Erfolg arbeiten können.

Nach wie vor habe ich über die Einrichtung des Mikroskops nichts gesagt; ich halte dafür, dafs, wer mikroskopieren will, die physikalischen Eigenschaften des Instrumentes kennen mufs. Über dieselben wird der Anfänger aber in einem Kolleg über Physik alles Wissenswerte erfahren.

Im übrigen darf ich wohl auf das Vorwort zur I. Auflage verweisen.

Den Herren Professor G. Fritsch, Professor W. Krause, Dr. Benda, Dr. Hansemann, Dr. L. Katz und Dr. Marinescu bin ich für mir bei Abfassung dieser Auflage gewährte bereitwillige Auskunft über einige Methoden zu Dank verpflichtet.

Berlin, Dezember 1894.

Rawitz.

Vorwort zur I. Auflage.

Die Absicht, die der Verfasser des vorliegenden Büchelchens verfolgt, ist die, dem Anfänger, der seine mikroskopischen Kurse absolviert hat, die Bahnen zu weisen, auf denen er bei eignen Untersuchungen mit einiger Aussicht auf Erfolg vorgehen kann, und dem erfahrenen, selbständigen Forscher eine leichte Orientierung über die bisher zu histiologischen Zwecken empfohlenen Methoden zu ermöglichen, die hier und da verstreut und häufig unter anderen Notizen versteckt sich finden.

Aus dieser Absicht heraus ergab sich die Einteilung des Stoffes. Es mufste zuerst die Beschreibung der Methoden selber gegeben werden und daran sich eine kurze Auseinandersetzung über ihre Verwendbarkeit bei der histiologischen Analyse der Gewebe und Organe des Metazoënkörpers knüpfen.

Hinsichtlich des zweiten Punktes, der Anwendung der Methoden, glaubte Verfasser sich aller der Auseinandersetzungen enthalten zu dürfen, welche tiefer auf die mikroskopische Anatomie eingingen. Histiologische Details sind daher nur so weit erwähnt, als sie mit dem rein Technischen verknüpft sind. Der erfahrene Forscher weifs diese Details selber, und der Anfänger soll den Leitfaden nur bei gleichzeitiger Konsultierung eines Lehrbuches der Histiologie oder unter den Auspizien des Lehrenden benutzen.

Hinsichtlich der Methoden war Verfasser bestrebt, Vollständigkeit zu erreichen, und er hofft, dafs ihm dies geglückt ist. Die den einzelnen Kapiteln vorausgeschickten Einleitungen enthalten für den Erfahrenen nichts Neues. Dem Anfänger aber dürfte wohl anzuraten sein, die darin gegebenen Regeln zu beachten; er wird dann vor manchem Fehlschlag, vor unnütz verwendeter Arbeitskraft und vor Materialvergeudung bewahrt bleiben.

Die in Kap. V des ersten Abschnittes empfohlenen Farbstoffe sind sowohl in Substanz, wie in Lösungen, wenn letztere sich haltbar

herstellen lassen, aus dem chemischen Laboratorium von Dr. GRÜBLER, Leipzig, Bayersche Strafse 12, wie aus dem Magazin für Mikroskopie von G. KÖNIG, Berlin N.W. Dorotheenstr. 29 zu beziehen. Ist für die Karmine und Hämatoxyline die Bezugsquelle im allgemeinen gleichgiltig, so ist dieselbe von grofser Wichtigkeit für die Anilinfarbstoffe, da die verschiedenen Fabriken dieselben in verschiedener Güte und oft mit ganz verschiedenen elektiven Eigenschaften herstellen. Verfasser bezieht seit Jahren die Aniline in Substanz durch das Institut von G. KÖNIG, seine Angaben haben daher auch nur für die von dort entnommenen Giltigkeit. Dieselben Fabriken liefern übrigens auch für das Laboratorium von Dr. GRÜBLER.

Bei manchen Methoden der Fixierung wie Färbung etc. hat Verfasser, wenn er die originale Darstellung nicht auffinden konnte, mit grofsem Vorteil die Lehrbücher der Histiologie von STÖHR und ORTH, die Techniken von FREY und FOL, sowie die Tabellen von BEHRENS benutzt.

Am Schlusse des Vorworts erfüllt Verfasser noch die angenehme Pflicht, den Herren Professor Dr. F. E. SCHULZE, Professor Dr. W. FLEMMING und Custos Dr. v. MÄHRENTHAL seinen aufrichtigsten Dank abzustatten für die liebenswürdige Bereitwilligkeit, mit der sie sein Unternehmen unterstützten. Professor Dr. F. E. SCHULZE und Dr. v. MÄHRENTHAL hatten die Güte, dem Verfasser einige neue, im zoologischen Institute hiesiger Universität seit langem geübte, aber noch gar nicht oder nur versteckt publizierte Methoden zu übergeben. Professor FLEMMING teilte mit liberalster Zuvorkommenheit dem Verfasser mehrere Details mit, die seine eignen Methoden sowie die von anderen Forschern herrührenden betrafen.

Berlin, Juni 1889.

Rawitz.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Vorwort zur II. Auflage III
Vorwort zur I. Auflage V
Inhaltsverzeichnis VII
Einleitung 1

I. Abschnitt. Die Methoden der Untersuchung 2

Kap. I. Die Untersuchung lebenden und überlebenden Materiales . 2

1) Untersuchung der Schwimmhaut vom Frosch 3
2) Untersuchung der Zunge 3
3) Untersuchung des Mesenterium 3
4) Untersuchung der Lunge 3
5) Untersuchung überlebenden Materiales 3
6) Anschneiden 4
7) Valentin'sches Doppelmesser 4

Kap. II. Die Methoden der Isolation 4

Allgemeine Bemerkungen 4
1) 1/3 Alkohol, Ranvier 5
2) 1/6 Alkohol, Solbrig 5
3) 1/4 Alkohol 5
4) Chromsäure 6
5) Buchholz'sche Methode 6
6) Arnold'sche Methode 6
7) 0,01%—0,05% Chromsäure 6
8) Landois-Gierke's Flüssigkeit 6
9) Ammonium bichromicum 0,025%—0,1% 6
10) Kali bichromicum 0,1% 6
11) Kali bichromicum 0,01%—0,005% 7
12) Kali bichromicum 4%—5% 7
13) 0,1% Osmiumsäure 7
14) 1% Osmiumsäure 7
15) 0,05% Osmiumsäure und 0,2% Essigsäure 7
16) Drost'sches Gemisch 7
17) Verdünnte Pikrinsäurelösung 7
18) Pikrinsäurealkohol 7
19) Jodserum 8
20) Kalt gesättigte wässrige Oxalsäurelösung 8
21) Haller'sches Gemisch 8
22) Apáthy'sches Gemisch 8

Seite

23) 20% Salpetersäure 8
24) Hopkins'sche Salpetersäure — Alaunmethode 8
25) Chlorsaures Kali mit Salpetersäure 8
26) Rohrzucker und schweflige Säure 9
27) Schweflige Säure 9
28) Reine Salzsäure 9
29) His'sche Pinselmethode 9
30) Schüttelmethode 9
31) Kühne'sche Verdauungsmethode 10

Kap. III. Die Methoden der Fixierung und Erhärtung . . . 10

Allgemeine Bemerkungen 10
1) Alkohol absolutus 14
2) Alkohol-Eisessig 14
3) Chromsäure 1/3%—1% 15
4) Chromameisensäure 15
5) Chromessigsäure, Flemming 15
6) Chromessigsäure, Lo Bianco 15
7) Chromsalpetersäure; Perényi'sche Flüssigkeit 15
8) Müller'sche Flüssigkeit 16
9) Erlicki'sche Flüssigkeit 17
10) Cox'sche Lösung 17
11) Foà'sche Lösung 17
12) Zenker'sche Lösung 17
13) 3 1/2% Salpetersäure 17
14) Salpetersäure — Müller'sche Lösung 17
15) Benda'sche Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode 18
16) Osmiumsäure 0,5%, 1%—2% in wässriger Lösung 18
17) Osmiumsäure in Dampfform 19
18) Osmiumessigsäure 19
19) Chromosmiumsäure, Flesch 19
20) Chromosmiumsäure, Lo Bianco 19
21) Chromosmiumsäureeisessig; Flemming'sche Lösung 19
22) Chromosmiumsalpetersäure 20
23) Altmann'sche Lösung 20
24) Kali bichromicum mit Osmiumsäure, Lo Bianco 20
25) Marchi'sche Methode 20
26) Osmiumfixierungen mit nachfolgender Holzessigbehandlung 21
27) Osmiumfixierungen und Nachbehandlung mit Pyrogallussäure 21
28) Osmiumsäurefixierung mit Tanninnachbehandlung 21
29) Pikrinsäure 21
30) Pikrinessigsäure 22
31) Pikrineisessig 22
32) Pikrinschwefelsäure; Kleinenberg'sche Flüssigkeit 22
33) Chrompikrinsäure, Lo Bianco 23
34) Chrompikrinsäure, Fol 23
35) Pikrinsalpetersäure 23
36) Chrompikrinsalpetersäure 24
37) Pikrinosmiumsalpetersäure 24
38) Pikrinessigosmiumsäure 24
39) Konzentrierte wässrige Sublimatlösung 24
40) Sublimat-Eisessig; Lang'sche Flüssigkeit 25
41) Sublimat-Essigsäure 25
42) Sublimat-Salpetersäure 25
43) Sublimat-Chromsäure 25
44) Sublimat-Pikrinsäure 25
45) Mann'sche Lösung 26
46) Sublimat-Kupfersulfat 26
47) 0,1% Palladiumchlorür 26
48) Platinchloridlösung 1/10%, 1/8%, 1/3% 26
49) Merkel'sche Flüssigkeit 26
50) Hermann'sche Flüssigkeit 26
51) Chromsäure und molybdänsaures Ammoniak 27

Anhang zu Kapitel II und III 27
1) Lysol 27
2) Formol 27

Seite

Kap. IV. Entkalken und Entfärben 27

a. **Entkalken** 27
1) 3%—9% Salpetersäure 28
2) Ebner's Entkalkungsflüssigkeit 28
3) Chlorpalladiumsalzsäure 28
4) Chromsalpetersäure 28
5) Chromsalzsäurepalladiumchlorür 28
6) Phloroglucinsalzsäure 28

b. **Entfärben** 28
7) Grenacher's Entfärbungsflüssigkeit 29
8) Alkoholische Natronlauge 29
9) Entfärbung mittels Chlordämpfen 29

Kap. V. Die Methoden der Einbettung 29

a. Einklemmen 30
1) Einklemmen in Leber 30
2) Einklemmen in Hollundermark 30
b. Umranden 31
c. Einbetten 31
3) Gudden'sche Masse 31
4) Paraffineinschmelzung 32
5) Celloidineinbettung 37
6) Photoxylin 40

Kap. VI. Schneiden und Aufkleben 41

a. **Schneiden** 41
1) Das Schleifen des Messers 41
2) Die Stellung des Messers 43
3) Freihandschneiden 46
4) Die Mikrotome 46

b. **Aufkleben** 49
5) Giesbrecht-Mayer'sche Schellackmethode 49
6) Schällibaum'sche Kollodiumnelkenölmethode 50
7) Eiweifslösung 50
8) Aufkleben mit destilliertem Wasser 51
9) Weigert'sche Kollodiummethode 52
10) Obregia'sche Photoxylinlappenmethode 52

Kap. VII. Die Methoden der Färbung 54

a. **Zweck der Färbung** 54
b. **Die Arten der Färbung** 55
c. **Die Vorbereitung zur Färbung** 58
d. **Die Farbstoffe** 59

α) **Die substantiven Färbungen** 59

I. Einfache Färbemittel 59

A. Karmin 59
1) Ammoniakalisches Karmin 59
2) Lithionkarmin 59
3) Salzsaures Karmin 59
4) Alkoholisches Boraxkarmin 60
5) Wässriges Boraxkarmin 60
6) Wässriges Alaunkarmin 60
7) Alkoholisches Alaunkarmin 60
8) Urankarmin 60
9) Karminsäure 61
9a) Karmalaun 61
10) Parakarmin 61
11) Alauncochenille 61

Seite

B. Hämatoxylin 61
12) Böhmer'sches Hämatoxylin 62
13) Delafield'sches Hämatoxylin 62
14) Glycerinalaunhämatoxylin 62
15) Ehrlich'sches Hämatoxylin 62
16) Chloralhämatoxylin 62
17) Kleinenberg'sches Hämatoxylin 63
18) Mayer'sches Hämalaun 63
19) Glycerinalaunhämatein 63
20) Hämacalcium 63

C. Die Anilinfarbstoffe 63
21) Fuchsin 64
22) Fuchsin nach Nissl 64
23) Safranin 64
24) Safranin nach Babes 65
25) Säurefuchsin 65
26) Dahlia 66
27) Gentianaviolett 66
28) Gentianaviolett nach Ehrlich 66
29) Bismarckbraun 66
30) Eosin 66
31) Orange G 66

II. Farbenkombinationen 66

Karmin-Hämatoxylin 66
32) Hämatoxylin-Karmin, Strellzoff 66
33) Karmin-Hämatoxylin, Fritsch 67

Zwei Karmine 67
34) Boraxkarmin-Indigkarmin 67

Karmin-Aniline 67
35) Pikrokarmin, Ranvier 67
36) Pikrokarmin, Weigert 68
37) Pikrokarmin, Hoyer 68
38) Pikrolithionkarmin, Orth 68
39) Boraxkarmin-Bleu de Lyon 68
40) Orange G-Alaunkarmin 68

Hämatoxylin-Aniline 68
41) Hämatoxylin-Safranin 68
42) Eosin-Hämatoxylin, Renaut 69
43) Eosin-Hämatein 69
44) Orange G-Hämatein 69

Zwei Aniline 70
45) Eosin-Methylgrün 70
46) Eosin-Methylblau 70
47) Safranin-Gentiana, Flemming 70
48) Safranin-Gentiana, Hermann 70
49) Safranin-Lichtgrün 70

Dreifachfärbungen 71
50) Pikrokarmin-Hämatoxylin 71
51) Ehrlich-Biondi'sches Gemisch 71
52) Ehrlich's Triacidgemisch 71
53) Oppel'sches Dreifarbengemisch 71
54) Flemming's Orangeverfahren 72

β) Die adjektiven Färbungen 72

I. Die Hämatoxylinlacke. 72
55) R. Heidenhain'sche Hämatoxylinfärbung 72
56) Benda'sche ältere Eisenhämatoxylinfärbung 73
56a) M. Heidenhain'sche Modifikation derselben 73

Seite
57) Benda's neuere Eisenhämatoxylinmethode 73
58) Benda'sche Kupferhämatoxylinfärbung 73
59) Weigert'sche Hämatoxylinfärbung 74
60) Pal'sche Hämatoxylinfärbung 75
61) Pal's Hämatoxylin mit Safranin 75

II. Die Anilinlacke 75
62) Tannin-Brechweinstein-Fuchsin oder Safranin oder Methylviolett oder Smaragdgrün 76

γ) **Die vitale Färbung** 77
Anhang. Tabelle der Synonyma der in der Histiologie gebräuchlichsten Anilinfarben 78

Kap. VIII. Die Metallimprägnation. 80
Allgemeine Bemerkungen 80
a. **Die Methoden der Vergoldung** 81
1) Cohnheim'sche Vergoldung 81
2) Hénocque'sche Goldmethode 81
3) Löwitt'sche Goldmethode 82
4) Ranvier'sche Goldmethode 82
5) Marinescu'sche Goldmethode 82
6) Flemming'sche Goldmethode 82
7) Golgi'sche Goldmethode 82
8) Osmiumgoldmethode 83
b. **Die Methoden der Versilberung** 83
9) Salpetersaures Silber nach Ranvier 83
10) Versilberung nach Deckhuyzen 83
11) Golgi'sche Methode der Versilberung 83
12) Fusari'sche Modifikation 83
13) Cajal'sche Modifikation 84
14) Kölliker'sche Modifikation 84
15) Golgi'sche Chromquecksilbermethode 85

Kap. IX. Das Aufheben der Präparate 85
a. **Feuchtes Aufheben** 85
1) Glycerin 85
2) 50% Kali aceticumlösung 86
3) Umrandung mit Wachs 86
4) Asphaltlack 86
5) Maskenlack 86
6) Krönig'sche Masse 86
b. **Trocknes Aufheben** 87
7) Venetianisches Terpentin 87
8) Terpentinöl 88
9) Bergamottöl 88
10) Nelkenöl 88
11) Kreosot-Terpentinöl 88
12) Weigert'sche Aufhellung 89
13) Kanadabalsam 89
14) Dammarlack 89

Kap. X. Die Methoden der Injektion 89
Allgemeine Bemerkungen 89
1) Gerlach'sche Karminmasse 91
2) Berlinerblau mit Oxalsäure 91
3) Transparentes Gelb 91
4) Kaltflüssige Injektion mit Berlinerblau 91
5) Altmann'sche Korrosionsmethode 92
6) Injektion mit Silbersalpeter 92

Seite

Kap. XI. Zeichnen und plastische Rekonstruktion 92
a. **Zeichnen** 92
b. **Plastische Rekonstruktion** 94

II. Abschnitt. Die Anwendung der Methoden 96

Vorbemerkung 96
A. Zelle und Gewebe 96

Kap. I. Die Zelle 96
a) Lebende Zellen 96
b) Überlebende Zellen 96
c) Zellteilung 97

Kap. II. Bindesubstanzen 99
α. **Bindegewebe sensu strictiori** 99
a) Ungeformtes Bindegewebe 99
b) Geformtes Bindegewebe 100
β. **Fettgewebe** 100
γ. **Schleimgewebe** 101
δ. **Reticuläre Bindesubstanz** 101
ε. **Knorpelgewebe** 101
a) Hyaliner Knorpel 101
b) Elastischer Knorpel 102
c) Faserknorpel 102
ζ. **Knochengewebe** 102
a) Knochenschliffe 103
b) Knochenschnitte 104
c) Knochenmark 104
d) Knochenentwickelung 105
η. **Zahngewebe** 105

Kap. III. Muskelgewebe 105
a) Quergestreifte Muskeln 105
b) Glatte Muskeln 107

Kap. IV. Blut 108

B. Organsysteme 111
1. Gruppe der vegetativen Systeme 111

Kap. V. Kreislaufsystem 111
a) Herz 111
b) Gefässe 111

I. Anhang zu Kap. V 112
Die Blutgefäfsdrüsen und Lymphknoten 112
a) Die Milz 112
b) Die Lymphknoten 113
c) Die Mandeln 114
d) Der Thymus 114

II. Anhang zu Kap. V 114
Drüsen mit unbekannter Funktion 114
a) Die Thyreoidea 114
b) Hypophysis, Steifsdrüse und Carotidendrüse 114
c) Die Nebenniere 115

Seite

Kap. VI. Atmungssystem 115
a) Die Luftwege 115
b) Die Lungen 115

Kap. VII. Verdauungssystem 116
a) Verdauungskanal 116
b) Die grofsen Verdauungsdrüsen 118
α) Speicheldrüsen 118
β) Leber 118

Kap. VIII. Harnsystem 119
a) Die Niere 119
b) Die ausführenden Wege 120

Kap. IX. Geschlechtssystem 121
α. **Weibliche Geschlechtsorgane** 121
a) Eierstöcke 121
b) Die Ausführungswege 122
c) Die Milchdrüsen 122
d) Placenta und Eihüllen 123
β. **Männliche Geschlechtsorgane** 123
a) Hoden 123
b) Die ausführenden Wege 124
Anhang zu Kap. IX 125
Eier und Embryonen 125

2. Gruppe der animalen Systeme 126

Kap. X. Zentrales Nervensystem 126

Kap. XI. Peripheres Nervensystem 132
a) Die peripheren Ganglien 132
b) Markhaltige Nervenfasern 133
c) Marklose oder graue Fasern 136
d) Nervenendigungen 136
α) Endigungen der motorischen Nerven 136
β) Endigungen der sensiblen Nerven 136

Kap. XII. Die Sinnesorgane 137
α. **Die Haut** 137
β. **Das Geschmacksorgan** 140
γ. **Das Geruchsorgan** 140
δ. **Das Gehörorgan** 141
a) Inneres Ohr 141
b) Mittleres Ohr 142
c) Äufseres Ohr 142
ε. **Das Gesichtsorgan** 142
a) Der Augapfel 142
1) Sclera 143
2) Cornea 143
3) Chorioidea 143
4) Iris 143
5) Linse 144
6) Glaskörper 144
7) Retina 144
8) Blut- und Lymphgefäfse 144
b) Die Schutzorgane des Auges 144
Register 145

Einleitung.

Je nach dem Ziele, welches bei einer mikroskopischen Untersuchung erreicht werden soll, ist der Gang, welchen dieselbe zu nehmen hat, ein verschiedener. Liegt die Absicht vor, den morphologischen Aufbau eines Organes, ohne Rücksicht auf die feinere Beschaffenheit der dasselbe zusammensetzenden Gewebsarten, oder den Bau eines Embryo oder eines erwachsenen sehr kleinen Tieres zu studieren, zu welchem Zwecke die Präparation mittels Messer, Schere und Pinzette nicht ausreicht, so mufs man das betreffende Objekt vorher erhärten und nach geeigneter Behandlung möglichst ohne Verlust in zahlreiche Schnitte zerlegen.

Das gleiche Verfahren ist einzuschlagen, wenn man die feinste Struktur der ein Organ zusammensetzenden Zellen erkennen will.

Für die rein morphologische Erkenntnis genügt eine solcher Art angestellte Untersuchung vollkommen. Wohl zerstört man durch das Schneiden den Zusammenhang der Teile eines Organes bez. Embryos etc., aber durch Vergleichung der einzelnen Schnitte miteinander und durch Kombination der dabei erhaltenen Resultate kann man den Fehler der Methodik wieder ausgleichen, man kann den Zusammenhang erschliefsen und ihn eventuell durch Anwendung einer plastischen Rekonstruktion in vergröfsertem Mafse zur Anschauung bringen.

Auch für die Erkennung des feineren Verhaltens der zelligen Elemente ist in den meisten Fällen die Schnittmethode ausreichend, aber eben nur in den meisten, nicht in allen Fällen. Denn man darf sich nicht verhehlen, dass durch die Härtung und durch die zur Ermöglichung des Schneidens nötigen Prozeduren, selbst wenn dieselben noch so schonend vorgenommen werden, die einzelnen Teile eines Organes und Gewebes in mehr oder minder beträchtlicher Weise verändert werden. Würde man daher seine Ansichten über den Bau eines Organes und die Struktur seiner Zellen *nur* auf Schnittbilder stützen, so könnte man unter Umständen leicht in Irrtümer bedenklicher Art verfallen. Um dieser Eventualität aus dem Wege zu gehen und für das Urteil die gröfstmögliche Sicherheit zu gewinnen, ist es daher nötig, aufser an Schnitten das Objekt noch auf andere Weise der Untersuchung mit dem Mikroskope zugänglich zu machen.

Die rationellste Methode wäre die Untersuchung des betreffenden Objektes im lebenden Körper oder die Untersuhcung des ganzen Tieres. Leider sind nur wenige Organe der Metazoën und nur wenige Tiere hinreichend durchsichtig, um brauchbare mikroskopische Bilder zu

liefern. Man muss daher das überlebende also frische Organ oder Gewebe vornehmen und auch das vorher in geeigneter Weise mazerierte und dann zerzupfte, um so die natürliche Form der zelligen Elemente, eventuell die Verbindung mancher Teile, z. B. den Übergang einer Nervenfaser in ihr Endgebilde, beobachten zu können. In den meisten oder wenigstens sehr vielen Fällen wird man auf diesem Wege das bestätigen können, was das Schnittbild bereits gelehrt hatte. Häufig aber wird man feinere Strukturen im frischen Objekte vermissen, die im gefärbten Schnitte deutlich hervortreten. Falsch wäre es dann aus dem Fehlen der Strukturen im frischen Präparate den Schlufs zu ziehen, dafs im gefärbten, von gehärtetem Materiale stammenden Schnitte das Plus artefizieller Natur, durch die angewandten Reagentien hervorgerufen sei. Viele intrikate Strukturen sind nämlich in frischen, überlebenden Zellen und Geweben zu durchsichtig, als dafs man sie ohne weiteres zu sehen im stande wäre. Es wird daher sorgfältiger Prüfung der angewandten Methoden und eingehender Überlegung bedürfen, um beim vergleichenden Studium frischen und konservierten Materiales die natürlichen Verhältnisse zu erkennen.

Man sollte, wenn irgend möglich, stets beide Methoden, weil sie sich in gewisser Weise ergänzen, nebeneinander anwenden, und nur dann kann man der Untersuchung frischen Materiales entraten, wenn bereits durch frühere Bearbeiter desselben Thema die wesentliche Übereinstimmung der mikroskopischen Bilder des frischen und des konservierten Objektes einwandfrei festgestellt ist.

I. Abschnitt.

Die Methoden der Untersuchung.

I. Kap. Die Untersuchung lebenden und überlebenden Materiales.

Nur wenige Organe der Metazoën sind, wie bemerkt, geeignet, um *im lebenden Körper* untersucht zu werden. Abgesehen von den Wirbellosen werden zur Zeit bei Vertebraten, und zwar hauptsächlich zum Studium des Blutkreislaufes, vorwiegend die Schwimmhäute zwischen den Hinterzehen der Frösche, die Zunge, das Mesenterium und die Lunge desselben Tieres benutzt. Bevor man die betreffenden Organe geeignet herrichten kann, mufs man die Tiere bewegungslos machen. Man erreicht das Ziel dadurch, dafs man den Fröschen bis eine halbe Pravaz'sche Spritze voll 1 % Curarelösung in den Lymphsack des Rückens einspritzt. Man muss dabei auf die Dosierung der Lösung und auf das Quantum derselben wohl achten, denn giebt man zuviel Curare, so tritt leicht Blutstase ein, infolge deren man es dann nicht mehr mit lebenden, sondern nur noch mit überlebenden Organen zu thun hat. Das zu injizierende Quantum richtet sich einmal nach der Gröfse des Frosches und dann darnach, ob man Frühjahrs- oder Winter-

frösche vor sich hat. Im Frühjahre frisch eingefangene Frösche vertragen nämlich mehr, als Frösche, welche das ganze Jahr über im Laboratorium ohne Nahrung ausgehalten haben.

1) Zur Untersuchung der *Schwimmhaut* legt man den curaresierten Frosch auf ein schmales Brett oder eine Korkplatte, die so lang sind, dafs das Tier bequem darauf Platz hat. Das eine Hinterbein kommt über eine grofse, kreisförmige Öffnung, welche über die Öffnung des Mikroskoptisches gelegt wird; die Zehen werden auseinandergespreizt und in geeigneter Weise (mit Stecknadeln oder Igelstacheln) seitlich von der Öffnung befestigt. Der ganze Frosch wird überdies, um eine Vertrocknung zu verhüten, stets in angefeuchtetes Filtrierpapier gepackt. Auf diese Weise erkennt man den *Kreislauf* und ferner das Verhalten der *Chromatophoren*.

2) Die *Zunge* des lebenden Frosches untersucht man in ähnlicher Weise, indem man dieselbe nach vorn umklappt und mit Nadeln fixiert. Aufser dem Kreislaufe kann man an diesem Objekte noch die *Nerven* und die *Muskeln* in lebendem Zustande beobachten. Zu diesem letzteren Zwecke empfiehlt es sich, das Organ mit einem Deckglase zu bedecken.

3) Das *Mesenterium* mufs aus dem curaresierten Tiere heraus präpariert werden, was ohne Blutverlust ausgeführt werden kann. Man macht zu dem Ende an der Seite des Bauches, in der Axillarlinie, einen Längsschnitt, in dem man zuerst die Haut und dann die Muskeln durchtrennt. Darauf zieht man eine Dünndarmschlinge hervor und befestigt dieselbe auf dem vorhin erwähnten durchlochten Brette oder der Korkplatte über der Öffnung. Nadeln oder Stacheln werden durch den Darm hindurchgestochen. Hier kann man in vorzüglicher Weise die *Diapedese* der Leukocyten und deren *amöboide Bewegung* studieren.

4) Um die lebendige *Lunge* des Frosches zu beobachten, bedarf es eines komplizierteren Apparates, als des bei den übrigen Organen angewandten. Am geeignetsten ist dazu der von Holmgren angegebene, der in jedem physiologischen Laboratorium vorhanden ist und in keinem histiologischen fehlen sollte. Hier wird zunächst eine Kanüle in den Kehlkopf eingeführt, damit die Lungen aufgeblasen werden können. Um das Entweichen der Luft zu verhüten, ist über das untere Ende der mit einem Hahne verschliefsbaren Kanüle ein Stückchen Froschblase gezogen, das natürlich die Öffnung nicht verdeckt, sich beim Einblasen der Luft aufbläht und so tamponartig den Kehlkopf verschliefst. Die Lunge wird in der Weise freigelegt, dafs in der Axillarlinie zunächst die Haut längs eingeschnitten wird. Dabei treten oberhalb und unterhalb des etwa centimeterlangen Schnittes zwei Venen hervor, die unterbunden werden müssen. Darauf wird vorsichtig die Muskulatur durchschnitten, wobei man sorgfältig jede Verletzung der Lunge selber zu vermeiden hat. Das Organ wird dann im Holmgren'schen Apparate ausgebreitet und, wenn nötig, aufgeblasen. Aufser dem Kreislaufe lassen sich ganz vorzüglich die lebenden *Nerven* beobachten.

5) Die Beobachtung *überlebender*, d. h. frisch dem Tierkörper entnommener *Gewebe oder Organe* kann man so vornehmen, dafs man mit einer feinen, auf die Fläche gebogenen Schere ein kleines Stückchen des zu untersuchenden Objektes abträgt und entweder ohne weiteren

Zusatz oder in einem Tropfen *Humor aqueus* oder *physiologischer Kochsalzlösung* (0,5 %—0,75 %) auf einen Objektträger bringt und mit einem Deckglase zudeckt. Häufig, besonders wenn der Schnitt etwas dick geraten ist, empfiehlt es sich, das Präparat mit zwei Stahl- oder Glasnadeln zu zerzupfen. Man hüte sich vor Anwendung gewöhnlichen oder destillierten Wassers, da dasselbe auf frische Gewebe aufserordentlich zerstörend einwirkt.

6) Man kann auch, und dies empfiehlt sich bei kompakten, zellenreichen Organen, das Objekt mit einem reinen Skalpell *anschneiden*, den auf der Schnittfläche hervorquellenden Inhalt mit dem Messer auf einen Objektträger abstreifen und ihn entweder ohne weiteres oder nach Zusatz eines Tropfens der oben erwähnten indifferenten Flüssigkeiten mit einem Deckglase bedeckt zur Untersuchung bringen.

7) Eine dritte, namentlich von pathologischen Anatomen vielfach geübte Methode besteht darin, dafs man mit einem Valentin'schen *Doppelmesser* einen möglichst feinen Schnitt durch das Organ macht und denselben in einer indifferenten Flüssigkeit untersucht. Man hat dabei den Vorteil, dafs man eine gröfsere Partie des Organs übersehen kann, als wenn man nur einen kleinen Bruchteil desselben mit der Schere abgetragen hat.

Kap. II. Die Methoden der Isolation.

Allgemeine Bemerkungen. Als allgemein giltige Regel ist anzusehen, dafs Organe oder Gewebe, welche der Einwirkung der die Isolation ermöglichenden Reagentien unterworfen werden sollen, stets frisch, womöglich noch körperwarm sein müssen. Ist das nicht der Fall, ist bei Warmblütern bereits vollständige Abkühlung eingetreten oder hat bei anderen Tierformen die Tödtung längere Zeit vor der zu beginnenden Untersuchung stattgefunden, so ist eine befriedigende, sichere Resultate ergebende mikroskopische Bearbeitung nicht mehr möglich. Denn nun ist bereits der Zelltod eingetreten und es haben kadaveröse Veränderungen in den Zellen Platz gegriffen, sodafs eine Erkennung der wirklich intra vitam vorhandenen Verhältnisse ausgeschlossen erscheint. Eine Verwertung der durch Untersuchung solcher abgestorbener Organe erhaltenen Resultate ohne anderweite Kontrole würde zu den bedenklichsten Irrtümern hinführen können.

Eine einzige Ausnahme ist hier zuzugeben, nämlich wenn es sich um menschliche Organe handelt. Diese kommen naturgemäfs fast niemals frisch in den Besitz des Forschers, aufser wenn sie auf operativem Wege gewonnen wurden; zur richtigen Würdigung der an solchen Objekten gemachten Beobachtungen wird man daher stets eine Vergleichung mit ähnlichen an den Organen der höheren Säuger gemachten anstellen müssen.

Eine fernere stets zu beobachtende Regel, gegen welche Anfänger nur zu oft zu ihrem Schaden verstofsen, ist die, dafs das zur Isolation vorzubereitende Stück und das Quantum der Isolationsflüssigkeit *in geradem Verhältnisse* zu einander stehen müssen. D. h. bei kleinen Objekten mufs wenig, bei grofsen *entsprechend* viel Flüssigkeit genommen werden. Thut man das nicht, nimmt man z. B. bei kleinen Objekten zu viel Flüssigkeit, so erhält man Härtung statt Mazeration.

Ist die Vorbereitung zur Isolation beendet, hat die betreffende

Flüssigkeit lange genug eingewirkt, dann nimmt man entweder das ganze Objekt oder ein Stückchen desselben heraus und bringt es in nur einen Tropfen der verwendeten Flüssigkeit oder in einen Tropfen Wasser oder in verdünntes oder reines Glycerin auf den Objektträger. Zu viel Flüssigkeit zum Zerzupfen zu verwenden schadet, weil dann das aufgelegte Deckglas schwimmt und durch die Strömungen, die unter demselben entstehen, die isolierten Teile mit fortgerissen werden.

Die Isolation, d. h. das Zerzupfen geschieht mittels feiner, in besonderen Haltern fest steckender Nähnadeln oder mit Glasstäbchen, die am Gebläseapparat in feine Spitzen ausgezogen sind. Das zu zerzupfende Objekt mufs, wie gesagt, möglichst klein sein; es wird mit der einen Nadel festgehalten, während die andere in schneller Aufeinanderfolge mit kurzen Zügen an seinem Rande zerrt und dadurch die Teile aus ihrer gegenseitigen Lagerung löst. Man zupft je nach dem Objekte entweder in dessen Längs- oder Querrichtung. Hat man ein Gebilde von faseriger Struktur vor sich, so zieht man dasselbe mit beiden Nadeln sorgfältig auseinander. Auch hier darf die Gröfse nicht zu beträchtlich sein, etwa 2 mm. nicht übersteigen, sonst ist eine ausgiebige Zerteilung nicht möglich.

Von grofsem Einflusse auf die Isolation, sowohl was die Zeitdauer, nach welcher, als auch den Grad anlangt, in welchem dieselbe möglich ist, ist die Temperatur der Umgebung. Im heifsen Sommer ist zuweilen schon nach kurzer, nur wenige Stunden dauernder Einwirkung des Reagens eine gute Resultate liefernde Zerzupfung ausführbar, während in der kalten Jahreszeit bei demselben Objekte und derselben Flüssigkeit oft Tage und Wochen erforderlich sind.

Um auf Zupfpräparate, namentlich wenn dieselben von sehr zarten Objekten angefertigt und nicht gefärbt worden sind, das System des Mikroskopes gut einstellen zu können, empfiehlt es sich, in das Präparat ein Haar oder eine feine Wollfaser zu bringen. Diese sucht man zuerst im mikroskopischen Bilde zu erfassen und kann dann bequem die isolierten Elemente aufsuchen. Andernfalls, wenn man ein solches Hilfsmittel nicht gebraucht, kann man den Tubus leicht zu tief senken und dabei Linse und Präparat zerstören.

Ich wende mich nun zu den einzelnen Isolationsflüssigkeiten, bemerke aber vorher noch, dafs nach der Mazeration eine Färbung mit einem der in einem späteren Kapitel zu erwähnenden Farbstoffe vor dem Zerzupfen vorgenommen werden kann.

Die oberste Stufe nehmen meines Erachtens die Verdünnungen des Alkohols, der Chromsäure und deren Salze ein.

1) $^1/_3$ **Alkohol, Ranvier** (Alcool au tiers). Man verdünnt 1 Volumen 90 % Alkohol mit 2 Volumina destillierten Wassers. Die Objekte, welche sehr klein sein müssen, kommen in die Flüssigkeit auf 24 Stunden und länger. Wenn nach drei Tagen noch keine genügende Isolationsfähigkeit vorhanden ist, mufs die Flüssigkeit gewechselt werden, weil sonst Fäulnis eintritt. Ist ganz vorzüglich für *Epithelien*, *Drüsenzellen* und *quergestreifte Muskeln*.

2) $^1/_6$ **Alkohol, Solbrig**. Man verdünnt 1 Teil käuflichen Weingeistes mit 5 Teilen destillierten Wassers. Schon nach 24 Stunden ist eine ausgiebige Isolation möglich. Besonders für das *Nervensystem wirbelloser Tiere* zu empfehlen.

3) $^1/_4$ **Alkohol.** Man verdünnt 1 Teil Alkohol absolutus mit 3

Teilen Aqua destillata. *Ich* habe diese Konzentration als ganz ausgezeichnet bei Untersuchungen über das centrale Nervensystem der Muscheln befunden. Noch nach 4—5 Wochen, wenn also die Ganglien so lange in der etwa alle 5—6 Tage gewechselten Flüssigkeit mazeriert wurden, waren die Teile ausgezeichnet erhalten. Die Isolation ist schon nach 48 Stunden möglich. Ich kann für das Studium des *Nervensystems der Evertebraten* diesen $^1/_4$ Alkohol nur dringend empfehlen. Er ist auch für Isolation von *Epithelien* geeignet.

4) **Chromsäure.** Wie der Alkohol, so ermöglicht auch die Chromsäure in starken Verdünnungen leichte Isolation. Der Grad der Verdünnung richtet sich nach dem Objekte, um das es sich handelt. Je zellenreicher, d. h. kompakter dasselbe ist, desto stärker mufs die Verdünnung, je zarter dasselbe, desto relativ konzentrierter mufs die Säure sein; die Schwankung bewegt sich zwischen 0,1 % und 0,005 %. Bestimmte Konzentrationen lassen sich nur für die wenigen nachstehenden Fälle angeben, im allgemeinen mufs jeder Forscher den für seine Zwecke geeignetsten Verdünnungsgrad sich selber ausprobieren. Konstanter in ihren Wirkungen sind die Lösungen der chromsauren Salze. Die angewandten Lösungen sind stets wässrige.

5) **Buchholz'sche Methode.** Dieser Forscher hat zur Isolation von Ganglienzellen bei *pulmonaten Gastropoden* zunächst eine Lösung von 0,01 % Chromsäure 24—48 Stunden einwirken lassen, dann eine solche von 0,05 % $^1/_2$—1 Stunde und erweichte schliefslich in indifferenter Flüssigkeit. Seine Resultate waren ausgezeichnet.

6) **Arnold'sche Methode.** Diese ganz vortreffliche Methode ist namentlich für die *peripheren Ganglien der Vertebraten* verwendbar, sowie für alle die Organe, deren zellige Elemente in viel Bindesubstanz eingebettet sind. Man legt das Objekt auf 5—10 Minuten in eine 0,1 % Essigsäre und überträgt direkt für 24—48 Stunden in 0,01 % Chromsäure. Die Isolation ist jetzt sehr leicht. Man kann in Pikrokarmin oder in 0.1 % Goldchloridlösung nachfärben. Namentlich mit letzterer (Reduktion in angesäuertem Wasser im Tageslichte) erhält man sehr schöne Bilder. Zerzupfen in verdünntem Glycerin.

7) 0,01 %—0,05 % **Chromsäure.** Organe, welche *glatte Muskelfasern* enthalten, kommen auf 24—48 Stunden in die Lösung. Darnach ist eine ausgiebige Isolation der glatten Muskeln möglich.

8) **Landois-Gierkes Flüssigkeit.** Man mischt je 5 Kubikcentimeter der konzentrierten wässrigen Lösungen von chromsaurem Ammonium, Kaliumphosphat und Natriumphosphat und setzt 100 ccm. destillierten Wassers hinzu. Diese Flüssigkeit, die einen bis mehrere Tage einwirken muss, wurde in jüngster Zeit von Lavdowsky mit ausgezeichnetem Erfolge zur Isolation der Elemente des *Centralnervensystems von Amphibien* verwendet.

9) **Ammonium bichromicum** 0,025 %—0,1 %. Zur Isolation von *Epithelzellen bei Evertebraten* geeignet, für Ganglienzellen nicht zu empfehlen.

10) **Kali bichromicum** 0,1 %. Von Deiters zur Isolation der *Vorderhornzellen des Rückenmarks* und der *Hirschgeweihzellen des Cerebellum* mit Recht sehr empfohlen. Nach zweitägiger Einwirkung führt die Zerzupfung bereits zu guten Resultaten. Auch für *Nervenzellen*

von Evertebraten kann ich diese Konzentration rühmen. Mit stärkeren Verdünnungen, 0,05 %—0,025 % bei 8—24 stündiger Einwirkung kommt man bei dem letzterwähnten Objekte ebenfalls zum Ziele. Nachfärben in Pikrokarmin möglich. Zerzupfen in verdünntem Glycerin.

11) **Kali bichromicum** 0,01 %—0,005 %. Deiters verwandte diese Verdünnung, um die *allerfeinsten Axencylinder*, die von den Protoplasmafortsätzen der polyklonen Ganglienzellen entspringen, deutlich darstellen zu können. Die Dauer der Einwirkung ist durch wiederholtes Probieren festzustellen. Sind mehrere Tage notwendig, ehe eine Isolation möglich ist, so ist die Flüssigkeit zu wechseln.

12) **Kali bichromicum** 4 %—5 %. Von Flemming zur Isolation von *indifferenten Epithelien* und *Sinneszellen* bei *Süfswassermuscheln* verwendet. Die Wirkung tritt frühestens nach einer Woche ein; eine Zerzupfung ist nicht mehr notwendig. Durch Klopfen mit der Nadel auf das Präparat, das in der Mazerationsflüssigkeit untersucht wird, fallen die indifferenten Epithelien ab und die Sinneszellen treten deutlich erkennbar hervor.

Die **Osmiumsäure,** welche in stärkeren Konzentrationsgraden ein gutes Fixierungsmittel ist, ermöglicht in schwächeren Lösungen ausgezeichnete Isolationen.

13) 0,1 % **Osmiumsäure.** Man legt *sehr* kleine Stücke des zu untersuchenden Objektes für 24 Stunden in die Flüssigkeit, spült sorgfältig in destilliertem Wasser ab und zerzupft in verdünntem Glycerin oder in 50 % Lösung von essigsaurem Kali. Für die *verschiedensten Organe*, besonders epitheliale, geeignet.

14) 1 % **Osmiumsäure.** *Nerven von Wirbeltieren* werden nach Neumann einer 24stündigen Einwirkung dieses Reagens unterworfen und kommen dann auf 24—48 Stunden in destilliertes Wasser. Jetzt ist eine leichte Isolation möglich.

15) 0,05 % **Osmiumsäure und** 2 % **Essigsäure.** Hertwig mischt von beiden Flüssigkeiten gleiche Quantitäten und empfiehlt das Gemisch zur Untersuchung von *Actinien*. Die Dauer der Einwirkung ist einige Minuten.

16) **Drost'sches Gemisch.** 0,25 gr. Chromsäure. 0,1 gr. Osmiumsäure und 0,1 gr. Eisessig werden in 100 ccm. Seewasser gelöst. Zur Isolation von *Epithelien niederer mariner Tiere* geeignet; die Objekte verweilen in dem Gemisch mehrere Tage. Verwendet man statt Seedestilliertes Wasser, so kann man auch bei Wirbellosen des Landes und bei Wirbeltieren gute Resultate erzielen.

17) **Verdünnte Pikrinsäurelösung.** 5—10 Tropfen der kalt gesättigten wässrigen Lösung der Pikrinsäure werden mit 15 ccm. destillierten Wassers verdünnt. Nach 12—24 Stunden erhält man vom *Nervensystem wirbelloser Tiere* vorzügliche Präparate. Bei kürzerer Einwirkungsdauer (4—8 Stunden) erhält man sehr gute Isolationen von *Epithel- und Drüsenzellen*. Die Zerzupfung wird in destilliertem Wasser vorgenommen.

18) **Pikrinsäueralkohol.** Hopkins empfielt zur Isolation von *Epithelzellen*, besonders *des Verdauungstraktes*, folgendes Gemisch: 95 % Alkohol 25 ccm., Wasser 75 ccm., Pikrinsäure 0,1 gr. Nach einigen Stunden ist die Isolation bereits möglich.

19) **Jodserum.** Nach Max Schultze versetzt man die Amniosflüssigkeit von Wiederkänerembryonen mit sehr viel Jodtinktur und filtriert. Zur Verhütung der leicht eintretenden Fäulnis giebt man einige Stückchen Kampher zu. Dieses Gemisch, das oft schon nach 24 Stunden, unter Umständen aber, die in dem zu untersuchenden Objekte liegen, auch erst nach Wochen wirkt, ist ein ausgezeichnetes Mazerationsmittel für die *verschiedenartigsten Organe.*

20) **Kalt gesättigte wässrige Oxalsäurelösung.** Max Schultze hat meines Wissens zuerst die Oxalsäure empfohlen, dann wurde das Reagens in ausgiebigster Weise von Boll angewendet. Sie ist ein vorzügliches Mazerationsmittel für *Epithel- und Drüsenzellen.* Nach 12—24stündiger Einwirkung werden die Objekte in destilliertem Wasser abgespült und in demselben zerzupft.

21) **Haller'sches Gemisch.** Bei *Mollusken* verwendete Béla Haller zur Isolation von *Sinneszellen* folgende Mischung: 1,2 Raumteile Aqua destillata, 0,4 Raumteile Glycerin und 0,4 Raumteile konzentrierter Essigsäure. Schon nach halbstündiger Einwirkung erhält man brauchbare Resultate. Vielleicht auch für Vertebraten (Schmeckbecher) geeignet.

22) **Apáthy'sches Gemisch.** Unter die Mazerationsflüssigkeiten kann man folgendes von Apáthy in jüngster Zeit angegebene Gemisch einreihen. 15 Teile Eisessig, 15 Teile Salpetersäure, 100 Teile Alkohol absolutus, 100 Teile Glycerin und 100 Teile Wasser werden miteinander vermengt. In 30 % Alkohol betäubte *Hirudineen* bleiben in dieser Flüssigkeit 24 Stunden, werden dann direkt, also ohne Abwaschen in eine mässige Menge von 70 % Alkohol übertragen, in welchem sie stark quellen. Nach 24 Stunden kommen die Würmer in 50 % Glycerin (mit Wasser verdünnt), das so oft gewechselt wird, bis es nicht mehr saner reagiert. Nach dieser Behandlung kann man die feinsten Verästelungen des *peripherischen Nervensystems* im Zusammenhange vom Ganglion bis zur Epidermis verfolgen. Es würde sich empfehlen, dieses Gemisch auch an anderen Objekten zu prüfen.

23) 20 % **Salpetersäure** wurde zuerst von Reichert zur Isolation *glatter Muskelfasern* angegeben. Nach 24stündiger Einwirkung zerlegen sich die Bündel in die kontraktilen Faserzellen, nach circa 3 Tagen fallen sie bei leichtem Schütteln auseinander.

24) **Hopkins'sche Salpetersäure — Alaunmethode.** Als eine Modifikation der vorigen Methode ist die folgende von Hopkins angegebene zu betrachten: Man legt die Objekte (*Magen, Darmkanal*) auf einige Zeit in 20 % Salpetersäure. Durch Probieren ist festzustellen, wann sich die Drüsenschicht von der Muskulatur trennen läfst. Ist eine solche Trennung leicht ausführbar, so wäscht man in Wasser aus und bringt in eine konzentrierte wässrige Alaunlösung, in welcher das Objekt beliebig lange Zeit verweilen kann. Zum Zerzupfen nimmt man kleine Stückchen.

25) **Chlorsaures Kali mit Salpetersäure.** Diese Methode wurde von Kühne zur Isolation der *quergestreiften Muskeln* angegeben. Man bedeckt den Boden eines Becherglases mit krystallisiertem Kali chloricum, befeuchtet ein wenig mit destilliertem Wasser und übergiefst mit dem vierfachen Volumen reiner konzentrierter Salpetersäure. Nun

rührt man um und bringt einen Muskel, z. B. Froschmuskel, auf den Boden des Glases unter die Krystalle. Meistens schon nach $^1/_2$ Stunde kann man ihn entfernen und in einem Reagensglase mit Wasser schütteln; er zerfällt dann leicht in seine Fibrillen. Tritt der Zerfall noch nicht ein, so legt man den Muskel in das Gemisch zurück und kann von 5 zu 5 Minuten von neuem das Schütteln vornehmen.

26) **Rohrzucker und schweflige Säure.** Klebs hat, wenn ich nicht irre, diese Mischung zuerst empfohlen, um *Epithelien* schonend von ihrer Unterlage zu lösen. Man setzt zu 1 ccm. einer 5 % Rohrzuckerlösung 1 Tropfen schweflige Säure. Nach 1—2 Stunden probiert man an einem kleinen Stückchen des Objektes, ob beim Schütteln desselben in Wasser die Epithelien sich loslösen. Unter nicht genau zu präzisierenden Umständen wird die Einwirkung des Gemisches oft länger ausgedehnt werden müssen.

27) **Schweflige Säure.** Diese Reagens wurde von Sandmann zur Isolation der Fasern *quergestreifter Muskeln* mit ausgezeichnetem Erfolge angewendet. Man bringt den Muskel in ein wohlverkorktes Reagensglas mit schwefliger Säure, je nach der Größe und dem Bindegewebsreichtum auf 1—8 Tage. Ist der Muskel zu voluminös, so zerteilt man ihn in passende Streifen parallel seiner Faserung. Nach der Behandlung mit schwefliger Säure wird der Muskel sorgfältig ausgewaschen und zwar in destilliertem Wasser, dann 3—4 mal, wobei jedesmal das Wasser zu erneuern ist, in destilliertem Wasser gekocht. Nach der Abkühlung schüttelt man ihn im Reagensglase tüchtig und nun zerfällt er in seine Fibrillen. Färbung mit Goldchlorid ist jetzt noch möglich. Man giebt auf 10 ccm. Aqua destillata 1—3 Tropfen einer 1 % Goldchloridlösung, läßt den Muskel darin, bis eine gelbe Färbung eintritt, wäscht aus und kocht von neuem in Wasser, das mit einem bis mehreren Tropfen Essigsäure angesäuert ist. Die *Nervenendigungen* sind trotz dieser eingreifenden Manipulation noch erhalten.

28) **Reine Salzsäure.** Um *Drüsenkanälchen* zu isolieren, legt man kleine Stücke des betreffenden Organes in etwa 10 ccm. reiner Salzsäure. Nach 10—20 Stunden Einwirkung wird in häufig zu wechselndem destillierten Wasser 24 Stunden lang ausgewaschen. Jetzt ist die Isolation leicht; die Untersuchung wird in destilliertem Wasser vorgenommen.

29) **His'sche Pinselmethode.** Eine eigenartige Methode der Isolation ist die von His angegebene Pinselung der Präparate. Man macht zunächst vom gut gehärteten Objekte auf feuchtem Wege einen Schnitt und bringt denselben in einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger. An einer Seite hält man den Schnitt mit einer Nadel fest und führt gleichzeitig einen Kamelhaarpinsel senkrecht in sanfter Bewegung über den Schnitt hinweg, entfernt auf diese Weise alle Zellen und isoliert dadurch die *bindegewebige Grundsubstanz*.

30) Die **Schüttelmethode** ist eine Modifikation der vorigen. Der vom gehärteteten Objekte gemachte Schnitt wird in einem Reagensglase mit Wasser anhaltend und tüchtig geschüttelt. So entfernt man schonender als bei der vorigen Prozedur die zelligen, das Organ charakterisierenden Elemente und isoliert die *Grundsubstanz*.

Beide Methoden sind hauptsächlich bei *den* Organen anwendbar,

bei denen die die physiologische Bedeutung bedingenden zelligen Elemente in einem bindegewebigen Stroma liegen, also bei allen echten Drüsen, allen Blutgefäfsdrüsen etc.

31) Die **KÜHNE'sche Verdauungsmethode.** Als eine Art von Isolation ist folgende, zuerst von KÜHNE und EWALD angewandte Behandlungsweise der Objekte zu betrachten. Dieselbe besteht in der Verwendung des Pankreasfermentes, des *Trypsins*. Man stellt sich dasselbe dadurch her, dafs das Pankreas eines eben geschlachteten Rindes mittels kalten Alkohols und Äthers im Extraktionsapparate so lange behandelt wird, dafs eine weifse, leicht zu zerreibende Masse zurückbleibt. Ein Gewichtteil derselben wird mit 3—10 Gewichtsteilen Salicylsäure von 0,1 % 3—4 Stunden bei 40 ° C. behandelt, dann wird durch Leinwand und nach dem Erkalten durch Papier filtriert. Man bringt in ein mit der so erhaltenen Flüssigkeit gefülltes Reagensglas Organteile und setzt dieselben mehrere Tage einer Temperatur von 37,5 ° C. im Brütofen aus. Dann werden die Objekte in einem Reagensglase mit Wasser tüchtig geschüttelt und in physiologischer Kochsalzlösung (0,75 %) untersucht. Statt der sauren Lösung ist unter Umständen eine alkalische erwünscht. Dieselbe wird so hergestellt, dafs man die saure Lösung mit Soda erst neutralisiert und dann alkalisch macht. Solche alkalische Lösung schimmelt leicht und wird dadurch unbrauchbar; man setzt daher um dies zu verhüten, soviel von einer alkoholischen 20 % Thymollösung zu, dafs die Mischung 0,5 % Thymol enthält.

So rationell die eben beschriebene Methode erscheint, so sind doch die bisher damit erzielten Resultate recht wenig Vertrauen erweckend und reizen nicht gerade zur Nachahmung.

Kap. III. Die Methoden der Fixierung und Härtung.

Allgemeine Bemerkungen. So wertvoll, wie dies in der Einleitung bereits hervorgehoben wurde, die Methoden zur Untersuchung lebenden, überlebenden oder nach geeigneter Mazeration zerzupften Materials auch sind, so werden sie doch nur in wenigen Fällen vollständig ausreichen. Feinere Strukturen, wenn diese den Gegenstand des Studiums bilden, kommen nicht immer und wenn, dann selten mit der nötigen Deutlichkeit zur Ansicht, teils weil das Objekt nicht dünn genug ist, teils weil die geringen Brechungsdifferenzen ein scharfes mikroskopisches Bild nicht liefern, teils auch, weil durch die Mazeration die Feinheiten zerstört sind. Die gegenseitigen Beziehungen der einzelnen Teile eines Organes zu einander, der Aufbau eines ganzen Körpers, z. B. eines Embryo, können überhaupt nicht mit den in den ersten beiden Kapiteln geschilderten Methoden erforscht werden. Hier mufs der Mikroskopiker neue Wege einschlagen, er mufs versuchen, das Studienobjekt so vorzubehandeln, dafs er es in dünne Schnitte zerlegen kann, die einen tieferen Einblick in die zu eruierenden Verhältnisse gestatten. Die Methoden, welche ihm zur Erreichung dieses Zieles dienen, sind die der *Fixierung* und *Erhärtung*.

Erhärten heifst das Objekt *schnittfertig machen*. Das gelingt im allgemeinen leicht; wir besitzen, wie weiter unten noch näher auseinanderzusetzen sein wird, ein hinreichend zuverlässiges Mittel, welches die *Schnittfähigkeit* eines Organes herbeiführt.

Anders steht es mit dem *Fixieren*. Es sei gleich hier gesagt, dafs wir ein *ideales* Reagens, welches allen Anforderungen unbedingt genügt, nicht haben. Jede der später zu erwähnenden Flüssigkeiten hat ihre Vorzüge, aber auch jede ihre Nachteile. Es genügt nicht immer, die Vorzüge eines zur Fixierung geeigneten Reagens zu kennen, fast noch wichtiger, mindestens aber ebenso wichtig ist es zu wissen, welche Nachteile mit der Anwendung verbunden sind. Denn nur wenn man beide Eigenschaften eines Reagens genau kennt, wird man wissen, ob dasselbe in dem betreffenden Falle überhaupt anwendbar ist, und wird nach Anwendung die Fehlerquellen zu berücksichtigen vermögen, um sich so vor verfehlten Arbeiten und übereilten Schlüssen zu schützen. In der nachfolgenden Aufzählung der einzelnen Fixierungsmittel sollen die Vorzüge und Nachteile eines jeden, soweit mir dieselben bekannt sind, hervorgehoben werden, man würde aber irren, wollte man meinen, nun dadurch in jedem einzelnen Falle gegen Fehlschläge geschützt zu sein. Der Momente, welche bei Beurteilung der Fixierungsresultate in Betracht zu ziehen sind, sind sehr viele und sie sind nicht blofs im Reagens selber gelegen. Viel hängt von der Beschaffenheit des Materiales ab, ob dasselbe von einem gut oder schlecht ernährten Individuum, ob von einem solchen stammt, das unter normalen Existenzbedingungen oder abnormen (im Laboratorium) längere oder kürzere Zeit gelebt hat. Von Einfluſs ist die Jahreszeit, die Temperatur des Arbeitsraumes, dessen Luftbeschaffenheit etc. Man muſs alle diese Umstände berücksichtigen, wenn man befriedigende Resultate erzielen will; um das aber zu können, bedarf es ausgedehnter Erfahrung, die auch nur dann zu erwerben ist, wenn man sorgfältig beobachtet und sich namentlich über das Mifslingen Rechenschaft zu geben sucht. Das alles aber sind Imponderabilien, die zu spezialisieren nicht möglich ist, die richtige Beobachtung aller Vorsichtsmafsregeln hängt hauptsächlich ab von der individuellen Geschicklichkeit des Forschers.

Woher aber kommt die nicht unbedingte Zuverlässigkeit der in der mikroskopischen Technik verwandten Fixierungsflüssigkeiten? Beim *Fixieren* beabsichtigen wir zweierlei. Erstens soll das Plasma der Zellen und Gewebe, wenn möglich, zur *sofortigen* Gerinnung gebracht werden, weil man mit Recht der Ansicht ist, dafs dadurch der augenblickliche physiologische und somit auch morphologische Zustand des betreffenden Materiales am natürlichsten erhalten wird. Man will gewissermafsen die einzelnen Teile in ihrer augenblicklichen Beschaffenheit zur *Erstarrung* bringen. Zweitens will man, dafs die zur Gerinnung bringende, d. h. fixierende Eigenschaft sich gleichzeitig durch alle Schichten, durch den ganzen Dickendurchmesser des zu fixierenden Objektes entfalte. Diese idealen Forderungen aber können wir nur in den allerseltensten Fällen erreichen. Mit dem Reagens kommt zunächst die Peripherie des Objektes in Berührung, hier findet also die erste Gerinnung statt. Durch das Geronnene hindurch aber kann das Reagens seine Wirkung schwerer entfalten, als wenn diese Schranke nicht da wäre, *es setzt sich also selbst seine Grenzen*, über die es *nur* allmählich hinausdringen kann. Das ist namentlich der Fall bei zellenreichen, kompakten Organen. Die Folge davon ist, dafs die im Zentrum des Objektes sich findenden Teile erst sehr viel später dem Einflusse des Reagens unterworfen werden, als die peripherischen, dafs dort daher bereits Veränderungen eingetreten sein *können* (nicht müssen), die von der Norm nicht unbedeutend abweichen.

Eine fernere Ursache für die mangelhafte Zuverlässigkeit der fixierenden Flüssigkeiten liegt in ihrer Zusammensetzung. Manche nämlich sind Gemische aus zwei und mehr gelösten Substanzen. Die verschiedenen Bestandteile haben sehr häufig ein verschiedenes Penetrationsvermögen, der eine ist bereits bis zum Zentrum vorgedrungen, während der andere die Peripherie noch nicht überschritten hat. Dadurch ergeben sich Unterschiede in der Art der Fixierung, die bei Verwertung der Beobachtungsresultate wol zu beachten sind. Gerade eines unserer besten Fixierungsmittel, die Flemming'sche *Lösung*, besitzt diesen Fehler, die Essigsäure derselben ist längst im Zentrum angelangt, während die Osmiumsäure noch in der Peripherie sich aufhält; darum ist auch meistens das Zentrum eines Organes durch diese Lösung anders fixiert als seine peripheren Partieen.

Aus diesen Betrachtungen und aus der Absicht heraus, die zu fixierenden Objekte in allen ihren Teilen möglichst schnell der Einwirkung der Reagentien zu unterwerfen, ergiebt sich *die Hauptregel*, die in erster Linie zu beachten ist, dafs das zu fixierende Objekt möglichst klein und die zum Fixieren verwandte Flüssigkeit möglichst reichlich vorhanden sein soll. Wenn irgend angängig, soll die Objektgröfse nicht mehr als 1 ccm. betragen, für welche etwa das 50fache des Volumen an Flüssigkeit zu verwenden ist. Quantität der Flüssigkeit und Dauer ihrer Einwirkung werden sich stets nach dem Objekte richten; bei zarten leicht permeablen Gebilden werden also beide geringer, bei kompakten zellenreichen beide gröfser sein müssen. Dabei ist stets darauf zu halten, dafs die Fixierungsflüssigkeit während der Dauer ihrer Einwirkung klar bleibt; tritt Trübung ein, so ist ein Flüssigkeitswechsel vorzunehmen, der so lange zu wiederholen ist, bis keine Trübung mehr sich zeigt.

Die Anforderung, dafs das zu fixierende Objekt möglichst klein gewählt werden soll, kann natürlich nicht erfüllt werden, wenn es sich um die *morphologische* Untersuchung von Embryonen, Säugetiergehirnen oder ganzen Tieren handelt. Bei den ersteren Objekten wird eine absichtliche Zerkleinerung erst dann Platz greifen dürfen, wenn die Entwickelung so weit gediehen ist, dafs die Lagebeziehungen der einzelnen Teile zu einander durch Präparation mit Messer und Pinzette klar erkannt werden können. Solange dies nicht der Fall ist, werden die Embryonen unversehrt in die Fixierungsflüssigkeit kommen müssen. Indessen sind die Gewebe in frühen embryonalen Stadien im allgemeinen sehr leicht permeabel, so dafs die Gröfse hier nicht von beträchtlichem Nachteil ist. Anders liegt die Sache bei Gehirnen; ist man gezwungen, dieselben in toto zu fixieren, so mufs man unter allen Umständen auf Gewinnung feinerer histiologischer Details Verzicht leisten.

Ferner ist bei jeder Fixierung in Betracht zu ziehen, dafs die angewandten Reagentien in mehr oder minder hohem Grade als Reize auf die Objekte wirken. Daher kontrahieren sich muskelreiche Organe oder Tiere, welch letztere bei zoologischen Untersuchungen oft in toto der Einwirkung der Fixierungsflüssigkeit unterworfen werden müssen, bisweilen derart, dafs eine vollständige Verzerrung der äufseren Form und damit auch eine Verlagerung der inneren Teile stattfindet, wodurch selbstverständlich eine mikroskopische Analyse unmöglich gemacht wird. Um muskelreiche Organe oder Gewebe in möglichst ausgestrecktem Zustande fixieren zu können, befestigt man daher die-

selben am besten mit Igelstacheln oder mit zugespitzten hölzernen Schusternägeln auf einem Stückchen Kork oder weichem Holz und wirft letzteres, das befestigte Objekt nach unten, in das Reagens. Ganz zu fixierende Tiere müssen vorher unbeweglich gemacht, gelähmt oder langsam getötet werden, doch hat letzteres den Nachteil, dafs sich häufig, z. B. bei Molluskeln, das Epithel der Körperdecke ablöst. Welches Mittel dafür verwendbar ist, richtet sich nach der Spezies, bisweilen nach dem Individuum. Ausführliche Vorschriften, die zu rekapitulieren hier nicht der Ort ist, findet man in der Abhandlung von Lo Bianco „Metodi usati" etc., die in den „Mitteilungen aus der zoologischen Station zu Neapel" erschienen ist.

In Folgendem wird eine gröfsere Anzahl von Fixierungsmethoden aufgezählt werden. Da mag denn wol der Anfänger und weniger Geübte fragen: welches der empfohlenen Fixierungsmittel ist gegebenenfalls anzuwenden? Meine Anwort würde lauten: alle die, welche sich bewährt haben und welche der Erfüllung der oben erwähnten idealen Forderungen am nächsten kommen. Ich pflege stets eine gröfsere Zahl von Fixierungsmitteln für dasselbe Objekt zu benutzen, weil die verschiedenen verschieden einwirken. Das eine ist geeigneter für Plasmastrukturen, das andere geeigneter für Kernstrukturen, jenes erschwert die Anwendung einer Anzahl Farbstoffe, während dieses dieselbe erleichtert; und umgekehrt. Zu einem richtigen histiologischen Verständnisse eines Organes oder Gewebes kann man meines Erachtens erst dann gelangen, wenn man verschiedene Methoden vergleichend anwendet.

Auf die Fixierung folgt die *Erhärtung*. Vielfach wird vorgeschrieben, dafs die Objekte, ehe sie in die erhärtende Flüssigkeit kommen, mit destilliertem oder gewöhnlichem und dann wenn möglich fliefsendem Wasser ausgewaschen werden sollen. Eine allgemeine Anwendbarkeit hat diese Vorschrift nicht, ja ich bin sogar der Ansicht, dafs das *Auswaschen* nur in wenigen Fällen von Vorteil ist. Gewisse Reagentien, wie die Pikrinsäure, vertragen überhaupt kein nachheriges Auswaschen, bei vielen anderen kann es sehr nachteilig einwirken. Ich möchte als Regel hinstellen, *dafs nur nach denjenigen Reagentien ausgewaschen werden soll, die aufser den fixierenden gleichzeitig erhärtende Eigenschaften besitzen oder die mit Alkohol Niederschläge geben;* nach Reagentien dagegen, die *nur* fixieren, sollte man nie auswaschen. Bei der Aufzählung der einzelnen Fixierungsmittel wird auf diese Frage jedesmal Rücksicht genommen werden.

Man nimmt die *Erhärtung* gewöhnlich so vor, dafs das Objekt zunächst in 70 %, dann in 80 %, endlich in 90 % Alkohol gebracht wird. Soll das Objekt längere Zeit aufbewahrt bleiben, ehe es zur Untersuchung gelangt, so hat dies in 80 %, 90 % oder 96 % Alkohol zu geschehen; ich wähle gewöhnlich den letzteren, da ich auch nach jahrelangem Verweilen in demselben keinen Nachteil wahrgenommen habe. 70 % Alkohol, den einige Forscher zur Aufbewahrung anwenden, wirkt auf die Dauer zerstörend ein. Aus dem 90 % kommt das Objekt in 96 %, dann in absoluten Alkohol, in welchem es schnittfähig wird. Die weitere Behandlung wird im fünften Kapitel auseinandergesetzt werden.

Bei der Überführung der Objekte aus dem fixierenden in das erhärtende Reagens entfaltet der Anfänger oft eine Sparsamkeit im Gebrauche des Alkohols, die ganz verfehlt ist. Dieselbe Regel, die für

die Fixierung gilt, die Anwendung grofser Flüssigkeitsquantitäten, greift auch hier Platz. Besonders deshalb, weil durch den Austausch des in den Geweben enthaltenen Wassers mit Alkohol letzterer in seiner Konzentration kontinuierlich geändert wird und schon nach kurzer Einwirkungsdauer keineswegs mehr erhärtende, sondern wie alle dünnen Alkohole häufig mazerierende Eigenschaften entwickeln wird. Also: viel Alkohol und, was aus den obigen Gründen als selbstverständlich erscheint, häufiger Wechsel desselben, bis die Härtung beendet ist.

Das alles, Fixieren und Härten, wie überhaupt alle zur Vorbereitung für die endliche mikroskopische Untersuchung notwendigen Methoden kosten Zeit und Aufmerksamkeit; und wer die letztere nicht anwenden kann und die erstere nicht übrig hat, der thut besser, von mikroskopischen Arbeiten abzustehen. Verwendet man aber beide in ausgiebigem Mafse, dann wird man auch durch gute, wissenschaftliche Resultate ergebende Präparate entschädigt.

Es möge nun die Beschreibung der einzelnen Methoden folgen:

1) **Alkohol absolutus.** Man stellt sich denselben am besten selber dar, indem man schwefelsaures Kupferoxyd im Metalltiegel glüht, wodurch es zu einem weifsen, äufserst hygroskopischen Pulver wird. Dieses bringt man in *grofser* Quantität in eine Flasche und gieſst 96 % Alkohol hinzu. Das geglühte Kupfer nimmt dem Alkohol den Rest Wasser und wird dadurch grünlich. Die Alkoholflasche ist mit einem Korkstöpsel zu versehen, da die eingeschliffenen Glasstöpsel niemals luftdicht schliessen. Vor dem Gebrauche ist der Alkohol durch ein doppeltes Faltenfilter zu gieſsen, da sonst ganz kleine Kupferpartikel mit dem zu fixierenden Organ in Berührung kommen und eine leichte Bläuung desselben hervorrufen können. Zur *Fixierung* ohne andere Reagentien sollte man stets nur den *absoluten* Alkohol verwenden. Die Wasser entziehende Wirkung desselben tritt gegen die das Eiweifs zur Gerinnung bringende zurück, während bei Alkohol von geringerer Konzentration die erstere überwiegt. Letzterer verursacht daher ohne vorherige Anwendung fixierender Reagentien nach meinen Erfahrungen stets hochgradige Schrumpfungen. Im Alkohol absolutus bleiben die Objekte etwa 3 Tage, wobei der Alkohol mindestens täglich zu wechseln ist. Sollen sie nicht sofort verwandt werden, so sind sie nach diesen 3 Tagen in 96 % Alkohol zu übertragen, weil sie andernfalls zu hart werden würden.

Im allgemeinen ist die Verwendung des Alkohols als alleinigen Fixierungsmittels nicht sehr zu empfehlen; er steht meines Erachtens jedem der später zu erwähnenden Reagentien entschieden nach, sowohl was die Erhaltung der Teile wie ihre Färbbarkeit anlangt; in Alkohol fixierte Objekte nehmen z. B. Karmin sehr schlecht an. Nur für die *grossen Verdauungsdrüsen* der Wirbeltiere und für *pathologisch-anatomisches* Material ist er von einigem Vorteil.

2) **Alkohol-Eisessig.** Diese Mischung wurde zuerst von E. van Beneden zur Abtödtung und Fixierung der *Eier von Ascaris megalocephala* verwendet. Die in den folgenden Zeilen notierte Modifikation derselben ist von Zacharias beschrieben. Zu 4 Raumteilen starken Alkohols wird 1 Raumteil Eisessig gesetzt; dann werden auf je 10 ccm. dieser Mischung 2—3 Tropfen einer 1 % Osmiumsäurelösung hinzugefügt. Je nach den zu fixierenden Stadien mufs das Material ver-

schieden lange in der Mischung bleiben, bis zu 20—25 Minuten. Beim Erwärmen auf 24° C. genügen 10—15 Minuten. Dann werden die Objekte 2—3 Stunden lang in absolutem Alkohol gewaschen und in 70 % Alkohol aufbewahrt.

3) **Chromsäure** $^1/_3$ %—1 %. Dieses Mittel ist zur Fixierung von *Kern- und Plasmastrukturen* ausgezeichnet. Man fängt im allgemeinen mit der schwachen Lösung an und steigt dann allmählich bis 1 %. Vielfach genügt aber auch ein 24stündiges Einlegen des sehr klein zu wählenden Objektes in die schwache ($^1/_3$—$^1/_2$ %) Lösung; die Chromsäure dringt schwer ein. Nach dem Fixieren *muss* man sorgfältig in destilliertem Wasser auswaschen, weil sonst durch den zur Nachhärtung verwandten Alkohol Niederschläge entstehen. Das Auswaschen kann vorgenommen werden, da die Chromsäure und ihre Gemische neben der fixierenden auch erhärtende Eigenschaften besitzen. Die Härtung in Alkohol hat allmählich durch successive Anwendung der oben erwähnten Konzentrationsstufen zu geschehen und muss im Dunkeln vorgenommen werden, damit keine Reduktion der Chromsäure zu Chromoxyd erfolgt. Der einzige Nachteil des Reagens besteht darin, dafs das Färbungsvermögen der einzelnen Gebilde mit den Karminen etwas leidet, die Aniline liefern dagegen gute Resultate. Für *alle Organe* verwendbar.

4) **Chromameisensäure.** Rabl empfiehlt folgendes Gemisch: Zu 200 ccm. einer $^1/_3$ % wässrigen Chromsäurelösung kommen 4—6 Tropfen konzentrierter Ameisensäure. Die Mischung ist jedesmal vor dem Gebrauche frisch zu bereiten. Die Objekte werden in kleinen Stücken auf 12—24 Stunden in die Lösung gebracht, dann in destilliertem Wasser gut ausgewaschen und langsam, d. h. durch Anwendung steigender Konzentrationen, in Alkohol erhärtet. Rabl hat beim Studium von *Zellteilungen* ausgezeichnete Resultate erhalten.

5) **Chromessigsäure; Flemming.** Man mischt 70 ccm. 1 % Chromsäure, 5 ccm. Eisessig und 90 ccm. destillierten Wassers. Die Objekte bleiben je nach ihrer Beschaffenheit 2—24 Stunden in der Flüssigkeit; zarte, leicht permeable werden kürzere, kompakte, minder durchdringliche längere Zeit in einem grofsen Quantum der Mischung gelassen. Man wäscht sorgfältig in Wasser aus und erhärtet in langsam steigendem Alkohol (70 %, 80 %, 90 %). Für *alle Gewebe und Organe* empfehlenswert, besonders zum Studium von *Kernteilungen*.

6) **Chromessigsäure; Lo Bianco.** Es werden 100 ccm. 1 % Chromsäure mit 10 ccm. konzentrierter Essigsäure gemischt. Die Objekte lässt man verschieden lange Zeit in der Flüssigkeit, wie bei No. 5. wäscht in destilliertem Wasser aus und härtet mit steigender Alkoholkonzentration. Für *alle Organe* verwendbar. Eine *schwächere Lösung von* Lo Bianco hat auf 100 Teilen 1 % Chromsäure nur 5 Teile konzentrierter Essigsäure; die Anwendungsweise ist dieselbe wie bei der stärkeren.

7) **Chromsalpetersäure; Perényi'sche Flüssigkeit.** Man mischt 4 ccm. 10 % Salpetersäure, 3 ccm. Alkohol von 96 % und 3 ccm. 0,5 % Chromsäure. Die Lösung wird sehr bald bläulich. In die Flüssigkeit kommen die Objekte auf 4—24 Stunden und werden in langsam steigendem Alkohol gehärtet. Ein Auswaschen mit Wasser mufs streng vermieden werden, weil die Salpetersäure eine Nach-

behandlung in Wasser nicht verträgt. Die Flüssigkeit ist für *Nematoden, Amphibien- und Fischeier* und für die *meisten Organe der Wirbeltiere* geeignet. Nur *epidermoidale* Bildungen dürfen mit derselben nicht behandelt werden, da die Epidermis sich unter der Einwirkung der Salpetersäure von ihrer Unterlage blasenförmig abhebt.

8) **MÜLLER'sche Flüssigkeit.** 2—2,5 gr. Kali bichromicum und 1 gr. Natron sulfuricum werden in 100 ccm. Wasser gelöst. Das Reagens entfaltet fixierende und erhärtende Eigenschaften. Zur Erkenntnis der *Plasmastrukturen* ist es ganz geeignet, während es zum Studium von Kernstrukturen gänzlich zu verwerfen ist, das letztere darum, weil das Chromsalz die Chromatinfäden zerstört. Nur bei Zusatz von Reagentien, welche die Kernstrukturen erhalten, ist die Lösung auch dafür brauchbar (cf. später). Will man in der MÜLLER'schen Flüssigkeit nur fixieren, so genügt ein Einlegen der Objekte für 8—14 Tage; dann wäscht man sorgfältig in destilliertem oder gewöhnlichem Wasser aus und härtet in Alkohol von steigender Konzentration. Will man in dem Reagens aber zugleich erhärten, so lässt man die Objekte mehrere Wochen in demselben und prüft von Zeit zu Zeit mit einem scharfen Rasiermesser die Schnittfähigkeit, die vollkommen erreicht werden kann. Man braucht in solchem Falle nicht nachzuhärten, sondern kann ohne weitere Einbettung mit einem befeuchteten Rasiermesser aus freier Hand Schnitte anfertigen. Für histiologische Übungskurse ist die Flüssigkeit ganz wertvoll, da sie gestattet, hinreichend viel Material längere Zeit vor dem Kurse vorzubereiten. Man kann in ammoniakalischem Karmin, in Alaunhämatoxylin und mit Anilinen die Schnitte färben.

Entschieden zu verwerfen ist die MÜLLER'sche Flüssigkeit für Fixierung von Organen der Evertebraten; so weit meine Erfahrungen reichen, wirkt sie hier stets mazerierend.

Ganz ausgezeichnet dagegen und zur Zeit von keiner anderen Flüssigkeit übertroffen ist die MÜLLER'sche Lösung zur Härtung von ganzen *Gehirnen und Rückenmark* und der Teile des *peripheren Nervensystems*. Centralnervensystem muſs 2—3 Monate in der Lösung bleiben, die in der ersten Woche täglich, später wöchentlich einmal gewechselt werden muſs. Um menschliche Gehirne zu härten, bedarf es oft mehr als eines Jahres. Die Organe, deren Härtung übrigens durch Anwendung von Brüttemperatur beschleunigt werden kann, werden in der Lösung schnittfähig, sodaſs sie ohne weiteres in geeigneter Weise in Serien zerlegt werden können. Will man sie aber nach der Härtung einbetten, so ist es notwendig, sie in Alkohol zu übertragen. Man kann sie zu dem Zwecke erst sorgfältig in Wasser auswaschen und dann in Alkohol, dessen Konzentration allmählich gesteigert wird, einbringen. Es ist selbstverständlich, daſs so voluminöse Organe, wie z. B. die Gehirne der Sänger sind, nicht bloss 24 Stunden in 70 % Alkohol verweilen dürfen. Hier muſs die Zeit für jeden Konzentrationsgrad beträchtlich ausgedehnt werden (auf mindestens eine Woche), man muſs stets viel Alkohol nehmen, denselben täglich mindestens einmal wechseln und im Dunkeln, zur Verhütung von Niederschlägen, aufbewahren. Man kann aber auch sofort in 96 % Alkohol übertragen und muſs sogleich ins Dunkle stellen; der Alkohol muſs häufig gewechselt werden. Im Sommer härtet die Lösung schneller als im Winter.

9) **Erlicki'sche Flüssigkeit.** Zur Erhärtung des *Zentralnervensystems* empfiehlt Erlicki folgende Mischung: 0,5 gr. schwefelsaures Kupferoxyd und 2,5 gr. Kali bichromicum werden in 100 ccm. destillierten Wassers gelöst. Hierin erhärtet sich Zentralnervensystem, wenn man es in den Brütofen bei 37° C. bringt, innerhalb 8—10 Tagen. Die Mischung ist nicht zu empfehlen, da sie Schrumpfungen in den Zellen hervorruft. Will man in Alkohol nachbehandeln, so ist vorher gründlich auszuwaschen.

10) **Cox'sche Lösung.** Nach Cox mischt man 20 Teile einer 5 % Lösung von Kali bichromicum, 20 Teile einer 5 % Lösung von Sublimat, 16 Teile einer 5 % Lösung von einfach chromsaurem Kali und 30—40 Teile Wasser. Hierin härtet man *Nervensystem* im Sommer mindestens einen Monat, im Winter 2—3 Monate.

11) **Foà'sche Lösung.** 100 ccm. Müller'scher Lösung werden fast zum Sieden gebracht und darin 2 gr. Sublimat gelöst. Die Mischung ist nach dem Abkühlen sofort zu gebrauchen. Kleine Stücke der Organe werden in eine reichliche Menge der Flüssigkeit für 2—3, mitunter auch für 24 Stunden bei 35° bis 40° C. gebracht und in Alkohol von steigender Konzentration gehärtet. Der Alkohol ist so oft zu zu wechseln, bis er rein bleibt. Ist besonders zur Fixierung der roten *Blutkörperchen* geeignet, die hierin ihr *Hämoglobin* behalten.

12) **Zenker'sche Lösung.** Man löst 5 gr. Sublimat, 2,5 gr. Kali bichromicum, 1,0 gr. schwefelsaures Natron in 100 ccm. Wasser und fügt 5 ccm. Eisessig zu. Es handelt sich also um eine Mischung von Müller'scher Lösung mit Sublimat und Eisessig; letzterer wird am besten erst kurz vor dem Gebrauche zugefügt. Die Lösung dringt leicht ein, die Organe schwimmen anfangs, sinken aber bald unter. Die Dauer der Einwirkung richtet sich nach der Gröfse des Objektes, sie schwankt zwischen 1 und 48 Stunden, für Nervensystem beträgt sie 14 Tage. Nach dem Fixieren wird gut in fliefsendem Wasser ausgewaschen und in Alkohol von steigender Konzentration nachgehärtet. Um das Sublimat aus den Geweben zu entfernen, setzt man zu dem 70 % Alkohol so viel Jodtinktur zu, bis eine Portweinfarbe vorhanden ist. Die Jodtinktur und mit ihr der 70 % Alkohol werden so oft erneuert, wie noch Entfärbung eintritt, bleibt der Alkohol braun, dann wird in 80 % übergeführt, der das Jod auszieht. Es ist die Färbbarkeit für alle Farbstoffe erhalten. Die Flüssigkeit eignet sich für *alle Organe* und soll vorzüglich die *Kernstrukturen* erhalten, offenbar infolge der Anwesenheit des Sublimats.

13) $3^1/_2$ % **Salpetersäure.** Engelmann hat, wenn ich nicht irre, zuerst die Salpetersäure zur Fixierung der *Retina der Vertebraten* verwandt. Man bringt den geöffneten Bulbus eines Säugetieres auf 1 bis 2 Stunden in die Säure und überträgt *sofort* in *absoluten* Alkohol. Auswaschen in Wasser und Anwendung schwächeren Alkohols ist dringend zu widerraten, weil dadurch eine Zerstörung der Retinaelemente nach meinen Erfahrungen herbeigeführt wird.

14) **Salpetersäure — Müller'sche Lösung.** Angelucci fixiert *Retina von Vertebraten* 30 Minuten bis 2 Stunden in 3 % Salpetersäure und überträgt für 10 Tage in Müller'sche Flüssigkeit. Man kann in Alkohol nachhärten. Hier dürfte sich ein der Härtung vorausgehendes Auswaschen empfehlen.

15) **Benda'sche Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode.** Benda empfiehlt, die frischen Objekte in eine Lösung der offizinellen Salpetersäure von 10 Vol. auf 90 Vol. Wasser zu bringen. Nach 24 bis 48 Stunden wird ohne vorheriges Auswaschen direkt in Kali bichromicum übertragen. Im Anfang wird 1 Vol. der kalt gesättigten Lösung dieses Salzes mit 3 Vol. Wasser verdünnt angewandt. Nach einigen Stunden Erneuerung der Kali bichromicum-Lösung und allmähliches Steigen in der Konzentration bis zu 1 Vol. Kali bichromicum auf 1 Vol. Wasser. Nach 2—3 Tagen ist die Durchtränkung meistens vollendet, nur Gehirn und Rückenmark bedürfen 14 Tage. Auswaschen, Nachhärten in Alkohol und dann Schneiden entweder mit dem Gefriermikrotom oder nach Anwendung einer der noch zu besprechenden Methoden der Einbettung. Mit Ausnahme von Embryonen und epidermoidalen Gebilden, weil bei letzteren die Epidermis durch die Salpetersäure abgehoben wird, *für alles geeignet;* nur werden die Objekte sehr hart und ihre Färbbarkeit ist verlangsamt.

16) **Osmiumsäure,** 0,5 %, 1 %—2 % **in wässriger Lösung.** Dies Reagens ist zur Fixierung der *verschiedensten Organe* mit gutem Erfolge zu verwenden. Je nach dem Objekte richtet sich die Konzentration; also bei zarten Objekten sind die schwächeren Lösungen, bei kompakteren die stärkeren zu verwenden. Ebenso hängt von der Beschaffenheit des Objektes die Einwirkungsdauer ab, die zwischen $^1/_2$ und 48 Stunden und mehr schwankt. Die Organe sind sorgfältig in destilliertem Wasser zu waschen und dann langsam in Alkohol zu erhärten. Nachträgliche Färbung in Karmin, Hämatoxylin, Fuchsin oder Safranin möglich.

Bei Anwendung der Osmiumsäurelösung ist ganz besonders zu beachten, dafs dieses Reagens seinem tieferen Eindringen in die Gewebe in viel höherem Mafse, als andere Fixierungsmittel, selber eine Grenze setzt, sodafs man nach 24stündiger, häufig selbst nach 48stündiger Einwirkung bei vollständiger Schwärzung der Randpartieen das Zentrum des Objektes von Osmium durchaus unberührt antrifft. Mehr als bei anderen Objekten hat man daher hier darauf zu achten, dafs das zu fixierende Stück klein, die verwendete Flüssigkeit reichlich vorhanden sei. Ein fernerer Übelstand, welcher die bisherige ausgedehnte Anwendung dieses Reagens stark einzuschränken geeignet ist, besteht darin, dafs häufig die Randpartieen eines Organes einen anderen Fixierungszustand zeigen als dessen Inneres. Leicht können daher durch die kritiklose Verwendung der durch Osmiumsäure erzielten Ergebnisse grobe Irrtümer entstehen. Eine solche Differenz in den Fixierungsresultaten betrifft namentlich die Struktur des Kernes, die durch zu heftige Osmiumwirkung völlig zerstört werden kann; am Rande hat man nur Krümel der Chromatinfäden, während dieselben im Innern des Präparates auf das schönste erhalten sind. Ganz dünne Objekte sollten daher, wenn irgend möglich, nicht mit Osmiumsäure und auch nicht mit deren Gemischen behandelt werden. *Osmium schwärzt intensiv die Fette* und bildet für die Erkennung dieser Bestandteile des Tierkörpers ein um so wertvolleres Hilfsmittel, als die osmierten Fette in den gewöhnlichen fettlösenden Mitteln nicht mehr oder nur noch wenig löslich sind.

Man thut gut, sich nur 50 ccm. einer 2 % Lösung als Stammflüssigkeit, aus der die gewünschten geringeren Konzentrationen mit

Leichtigkeit sich herstellen lassen, vorrätig zu halten, da die Lösung bei längerem Stehen verdirbt; sie ist dann schwarz. Die mit einem Glasstöpsel oder einem Korken — letzterer wird durch Osmiumsäure geschwärzt; das hat aber nach meinen Erfahrungen auf die Wirkung der Säure keinen Einfluss — zu verschliefsende Flasche, in der die Lösung sich befindet, mufs dunkelfarbig sein und im Dunkeln aufbewahrt werden. Bei Anwendung der Osmiumsäure, namentlich beim Öffnen der zugeschmolzenen Glasröhrchen, in denen sie versandt wird, ist grofse Vorsicht nötig; die Dämpfe der gelben Krystalle rufen sehr leicht heftige Entzündungen der Augenbindehaut und der Schleimhaut der Luftwege hervor.

17) **Osmiumsäure in Dampfform.** Ranvier hat wohl zuerst darauf aufmerksam gemacht, dafs Osmiumdämpfe viel besser ein Organ durchdringen als die Lösung. Will man mit den Dämpfen fixieren, so hängt man das Objekt in einer Flasche oder Schale, deren Boden von einer nur wenige Millimeter hohen Schicht der 2 % Lösung bedeckt ist, so auf, dafs es in diese Schicht nicht eintaucht. Um allzustarke Krümmungen zu vermeiden, wie sie unter der Einwirkung der Dämpfe in kontraktilen Organen auftreten, kann man in geeigneter Weise den unteren Rand des Objektes durch ein kleines Gewicht anspannen. Nach 24 Stunden wird in Alkohol, dessen Konzentrationsgrade allmählich gesteigert werden, erhärtet.

18) **Osmiumessigsäure.** Man mischt je 50 ccm. einer 0,2 % Essigsäure und einer 0,05 % Osmiumsäure; die Osmiumsäure ist, wenn es sich um Fixierung von Organen *mariner Tiere* handelt, in Seewasser zu lösen. Nach 5—15 Minuten wird in 1 % Essigsäure ausgewaschen und in Glycerin aufgehoben. Ist nach Eimer und Hertwig für *Coelenteraten, Würmer* und das *Nervensystem von Evertebraten* sehr wertvoll.

19) **Chromosmiumsäure.** Flesch empfiehlt folgende Mischung: 1 % Osmiumsäure 10 ccm., 1 % Chromsäure 25 ccm., Aqua destillata 65 ccm. Die Objekte bleiben in dem Gemisch 24—36 Stunden. Man bringt *direkt* in 70 % Alkohol und erhärtet langsam. Soll für das *innere Ohr der Vertebraten* wertvoll sein.

20) **Chromosmiumsäure, Lo Bianco.** Man mischt 2 ccm. 1 % Osmiumsäurelösung und 100 ccm. 1 % Chromsäure. In der Mischung bleiben die Objekte je nach ihrer Beschaffenheit 2 bis 24 Stunden; man wäscht in Wasser aus und härtet langsam in Alkohol.

21) **Chromosmiumsäureeisessiglösung; Flemming'sche Lösung.** Dieses von Flemming empfohlene Gemisch erfreut sich der weitesten Anwendung, namentlich beim Studium von *Zellteilungen*, und ist sicher ein *ausgezeichnetes*, für die *verschiedensten Organe* verwendbares Fixierungsmittel. Die Zusammensetzung ist die folgende: 15 Teile 1 % Chromsäure, 4 Teile 2 % Osmiumsäure und 1 Teil Eisessig. Die Lösung kann in einer durchsichtigen Flasche aufbewahrt werden und hält sich sehr lange. Die Dauer der Einwirkung schwankt zwischen einigen Stunden bis zu 2 und 3 Tagen. Man wäscht sorgfältig in destilliertem Wasser aus und bringt dann gleich in 96 % Alkohol ein, der in den ersten Tagen, solange er noch gelb wird, häufig zu wechseln ist.

Man hält sich das Gemisch in der oben angegebenen Konzentration vorrätig. In diesem *starken* Gemisch werden schwer permeable, dichte und etwas gröfsere Objekte fixiert. Bei kleineren und weicheren

kann man dasselbe ziemlich beliebig verdünnen; bei *sehr* dünnen und zarten mit dem 10 bis 20fachen Vol. destillierten Wassers. Bestimmte Verdünnungsgrade einzuhalten ist nicht unbedingt nötig, denn es kommt, wie Prof. Flemming mir bei Abfassung der ersten Auflage geschrieben, „auf einen ‚Schufs' mehr oder weniger von einer der Säuren nicht viel an."

So unstreitig die Vorzüge dieser Flüssigkeit, die namentlich *Plasma- und Kernstrukturen* gut fixiert, auch sind, so haften ihr dennoch einige Nachteile an, die man wohl zu beachten hat. Dieselben sind an die Osmiumsäure geknüpft. Am leichtesten dringt von den drei Säuren der Eisessig ein, dann kommt die Chromsäure, am schwersten dringt die Osmiumsäure ein. Bei sehr kompakten Organen hat man daher, wenn die Objekte zu kurze Zeit in der Lösung verweilt haben, im Innern gar keine Osmiumwirkung, während dieselbe am Rande relativ sehr stark ausgefallen sein kann. Dadurch wird das Färbungsvermögen der Objekte ein ungleiches, man sieht in einem Schnitte nicht blofs verschiedene Nüancen des Farbstoffes, sondern hat auch anscheinend mit verschiedenen chemischen Affinitäten sonst identischer Organbestandteile zu demselben Farbstoffe zu thun. Dann kann durch die zu starke Osmiumwirkung sehr leicht das Strukturbild des Kernes zertrümmert werden, indem, wie vorhin schon bei der Osmiumsäure hervorgehoben wurde, die Chromatinfäden zerbröckeln. Man sollte daher, wenn man kompaktere Objekte in der Flemming'schen Lösung fixiert hat, stets nur die zentralen Teile der Schnitte berücksichtigen, und wenn man Organe fixieren will, die dünnere und dickere Partieen haben und wenn die dünneren das Untersuchungsobjekt abgeben, sich nur *sehr* schwacher Lösungen bedienen.

Die in der Flemming'schen Lösung fixierten Objekte werden am besten in Hämatoxylin und den Anilinen gefärbt.

22) **Chromosmiumsalpetersäure.** Burckhardt empfiehlt folgendes Gemisch: 1 % Chromsäure 200 ccm., konzentrierte Salpetersäure 10 ccm., 2 % Osmiumsäure 10 ccm. Die Objekte bleiben 2—24 Stunden und länger in der Lösung, werden dann in Wasser ausgewaschen und langsam in Alkohol erhärtet. Für *Nervensystem von Amphibien* geeignet. Man wirft z. B. den ganzen Schädel in die Lösung, in welcher zugleich durch die Salpetersäure die Knochen entkalkt werden.

23) **Altmann'sche Lösung.** Man mischt nach Altmann gleiche Volumina einer 5 % Lösung von Kali bichromicum und 2 % Lösung von Osmiumsäure. Hierin bleiben die sehr kleinen Objekte 24 Stunden, dann werden sie mehrere Stunden in Wasser ausgewaschen und in allmählich steigendem Alkohol erhärtet. Zur Darstellung der Altmann'schen *Granula* geeignet. Ich halte die Lösung nicht für ungefährlich und glaube, dafs sie die Kern- und Plasmastrukturen zerstören kann.

24) **Kali bichromicum mit Osmiumsäure.** Nach Lo Bianco mischt man 100 ccm. einer 5 % Lösung von Kali bichromicum mit 2 ccm. 1 % Osmiumsäure. Die kleinen Objekte bleiben mindestens 24 Stunden in der Lösung, werden dann in Wasser gewaschen und langsam in Alkohol gehärtet. Dürfte zur Darstellung histiologischer Verhältnisse, wenigstens was die feineren Zellstrukturen anlangt, nicht ganz ungefährlich sein.

25) **Marchi'sche Methode.** Man härtet kleine Stücke von *Zentral-*

nervensystem 8 Tage in MÜLLER'scher Lösung und überträgt *direkt, ohne Auswaschen*, in eine Mischung von 2 Teilen MÜLLER'scher Lösung und 1 Teil 1 % Osmiumsäure ebenfalls für 8 Tage. Dann wird gut ausgewaschen und langsam in Alkohol gehärtet. Die Methode wird sehr viel von Gehirnpathologen zur Erkenntnis von Ganglienzellen- und Nervendegenerationen angewendet.

26) **Osmiumfixierungen mit nachfolgender Holzessigbehandlung.** Um eine gleichmäfsige Reduktion der Osmiumsäure in den einzelnen Teilen der in der reinen Säure oder deren Gemischen fixierten Organe herbeizuführen, verwandte v. MÄHRENTHAL *rohen Holzessig*. Die aus der Osmiumsäure oder dem Osmiumgemische entnommenen Objekte werden in destilliertem Wasser ausgewaschen und dann in den rohen Holzessig gebracht, dessen Einwirkung man von 2 bis auf 24 Stunden ausdehnen kann. Dann werden die Objekte sehr sorgfältig gewaschen und langsam in Alkohol erhärtet. Diese Methode ist geeignet, *feinste nervöse Elemente* zur Anschauung zu bringen. *Sinneszellen* und *Nerven* erscheinen ganz dunkel, das übrige Gewebe grau, aber mit deutlicher Differenzierung der einzelnen Bestandteile, die Kerne sind hell. Das mikroskopische Bild gleicht nach Prof. SCHULZE einem gut ausgeführten Lithogramm.

HERMANN verwendet den Holzessig an Präparaten, die bereits in Alkohol gehärtet sind. Auch hier ist die Reduktion der Osmiumsäure und die damit bedingte Schwärzung eine vollkommene. Vorbedingung für den Eintritt der Holzessigwirkung ist allerdings, dafs die Präparate nicht zulange in Alkohol gelegen haben.

27) **Osmiumfixierungen und Nachbehandlung mit Pyrogallussäure.** KOLOSSOW legt die in Osmiumsäure und Osmiumsäuremischungen (die von ihm selber angegebene Mischung wird wegen ihrer wenig rationellen Zusammensetzung nicht angeführt) fixierten Objekte in eine Entwickelungsflüssigkeit von folgender Zusammensetzung: Aqua destillata 450 ccm., Alkohol 85 % 100 ccm., Glycerin 50 ccm., Tannin 30 gr., Pyrogallussäure 30 gr. In der Entwickelungsflüssigkeit bleiben die Objekte 5—10 Minuten und kommen dann in eine $^1/_4$ % wässrige Lösung der Osmiumsäure.

28) **Osmiumsäurefixierung mit Tanninnachbehandlung.** Zur ausgiebigen Reduktion der Osmiumsäure wende *ich selber* seit längerer Zeit 20 % Tanninlösung an, in welche die gut gewaschenen osmierten Objekte für 24 Stunden eingebracht werden. Nach dem Tannisieren wird sehr sorgfältig mehrere Stunden lang ausgewaschen und langsam in Alkohol erhärtet. Der Alkohol wird so oft gewechselt, bis er klar bleibt. Die Schwärzung ist eine vollkommene.

29) **Pikrinsäure.** Vielfach wird die reine Pikrinsäure als kalt gesättigte wässrige Lösung zur Fixierung angewendet. Die Objekte verweilen in derselben einige Minuten bis einige Stunden und werden dann in Alkohol langsam erhärtet. Die von manchen Autoren gegebene Vorschrift, dafs man nach Pikrinsäurefixierung in Wasser auswaschen soll, halte ich für *durchaus falsch. Wasser wirkt geradezu zerstörend auf die mit Pikrinsäure behandelten Teile ein und ist daher unter allen Umständen zu vermeiden*, möge man nun in reiner Pikrinsäure oder in einem Pikrinsäuregemisch fixiert haben. Die Objekte müssen *direkt* in 70 % Alkohol übertragen werden, dem dann die stärkeren Konzen-

trationsgrade allmählich folgen. Nach Anwendung starker Pikrinlösungen bleiben die Objekte meistens gelb gefärbt, was von manchen Forschern als ein Nachteil empfunden wird. Thatsächlich ist ein solcher nach meinen Erfahrungen nicht vorhanden, da die Pikrinsäure aus dünnen Schnitten durch den zur Vertreibung des Terpentins verwandten Alkohol völlig ausgezogen wird; aber selbst wenn das nicht der Fall sein sollte, so erwächst für die Färbung aus dem zurückgebliebenen Pikrin im allgemeinen kein Nachteil, nur bei säureempfindlichen Farbstoffen kann sich ein Übelstand einstellen. Wer indessen farblose, also pikrinfreie Objekte haben will, der kann sich der nachfolgenden von Jelinek angegebenen Methode bedienen. Man setzt zu dem 96 % Alkohol, in welchem die gehärteten Pikrinpräparate sich befinden, einige Tropfen einer kalt gesättigten wässrigen Lösung von Lithion carbonicum. Es entsteht sofort ein zarter Niederschlag, der gelb wird, weil er das Pikrin an sich reifst, und sich allmählich löst. Man setzt so lange das Lithion zu, bis der Niederschlag sich nicht mehr löst und auch eine Gelbfärbung des Alkohols nicht mehr auftritt. Der Alkohol mufs häufig gewechselt werden.

Viel besser und zuverlässiger als die reine Pikrinsäure sind deren Mischungen mit andern Säuren.

30) **Pikrinessigsäure.** Man setzt nach Hertwig zu 100 ccm. kalt gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung 3—5 ccm. Essigsäure hinzu. Für *Eier von wirbellosen Tieren* und für *Embryonen* von jedem Typus sehr geeignet. Man läfst die Objekte ½ Stunde bis 1 Tag in der Flüssigkeit und bringt direkt in 70 % Alkohol, der allmählich mit stärkeren Konzentrationsgraden vertauscht wird.

31) **Pikrineisessig.** Davidoff empfiehlt für *Eier von kompositen Ascidien* folgendes Gemisch: 3 Teile gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung und 1 Teil Eisessig. Die Objekte bleiben 3—4 Stunden in dieser Fixierungsflüssigkeit und werden dann sofort in 70 % Alkohol übertragen, der sehr häufig zu wechseln ist. Sie dürfen vor der Einbettung nicht zu lange in absolutem Alkohol verweilen, da sonst die dotterreichen Eier zu hart werden.

32) **Pikrinschwefelsäure; Kleinenberg'sche Flüssigkeit.** Die Mischung wird in folgendem Verhältnisse vorgenommen: Kalt gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 100 ccm., konzentrierte Schwefelsäure 2 ccm., Aqua fontana 300 ccm. Bei Zusatz der Schwefelsäure zur Pikrinsäure schlagen sich Pikrinkrystalle nieder, die sich indessen bei der Verdünnung mit Wasser wieder lösen. Je nach der Natur des Objektes richtet sich die Dauer des Aufenthaltes desselben in dem Gemisch, die 3 Stunden nicht übersteigen darf. Das Objekt kommt aus dem Reagens direkt in 70 % Alkohol und wird in diesem so lange ausgewaschen, d. h. der Alkohol wird so lange gewechselt, bis er farblos bleibt, das Pikrin also ausgezogen ist. Dann 80 %, 90 % Alkohol. Diese Mischung wirkt auf die Bindesubstanzen quellend ein, was durch so viel Zusatz von *Kreosot*, als sich in der Flüssigkeit lösen will, vermieden werden kann. Für zarte Organismen — *Coelenteraten, Süsswasserbryozoën* — ist die Kleinenberg'sche Flüssigkeit ein ganz aufserordentlich wertvolles und kaum zu entbehrendes Fixierungsmittel. Sobald es sich aber um zellenreiche, kompakte Organe handelt, ist sie wertlos, weil ihre Durchdringungsfähigkeit eine ganz geringe ist;

und sind in dem zu fixierenden Objekte Kalksalze vorhanden, so wirkt sie geradezu verderblich, weil durch die Verbindung der Schwefelsäure mit dem Kalk unlöslicher Gips entsteht, der eine weitere Verwendung des Materiales zu mikroskopischen Zwecken unmöglich macht. Das Färbungsvermögen ist für alle Farbstoffe erhalten.

33) **Chrompikrinsäure** nach Lo Bianco. Man mischt gleiche Quantitäten 1 % Chromsäure und Kleinenberg'scher Flüssigkeit. Die Verwendung ist für histiologische Zwecke die gleiche wie die der Kleinenberg'schen Flüssigkeit; auch hier darf nicht in Wasser ausgewaschen werden, sondern man muſs sofort nach beendeter Fixierung in 70 % Alkohol übertragen.

34) **Chrompikrinsäure** nach Fol. 10 Vol. konzentrierter wässriger Pikrinsäurelösung werden mit 25 Vol. 1 % Chromsäure und 65 Vol. Wasser gemischt. Diese Flüssigkeit soll eine ausgezeichnete Fixierung der *meisten Organe* liefern, ohne die Färbbarkeit derselben einzuschränken. Nach der Fixierung ist sofort in 70 % Alkohol zu übertragen und langsam zu erhärten. Die Penetrationskraft ist nur eine geringe, daher sind nur kleine Objekte zu verwenden. Vor dem jedesmaligen Gebrauche kann man für Erzielung einer energischen Wirkung noch 0,005 Osmiumsäure zusetzen.

35) **Pikrinsalpetersäure.** Dieses vortreffliche Fixierungsmittel wurde zuerst von Paul Mayer empfohlen. Ich stelle mir dasselbe stets in folgender Weise dar: Zu 100 ccm. kalt gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung setze ich 2—3 ccm. offizineller Salpetersäure. Durch den Zusatz wird Pikrin in Krystallen ausgefällt. Man schüttelt im Anfang häufig um, überläſst dann die Mischung 24 Stunden sich selber, schüttelt von neuem um und filtriert. In die nunmehr klare Lösung kommen die Objekte auf eine Zeitdauer, die von 10 Minuten bis 24 Stunden schwankt. Man kann kompakte Organe ganz unbesorgt einen Tag in der Mischung lassen, es wird nichts zerstört; bleiben sie zu kurze Zeit in derselben, so ist nur der Rand fixiert, während in's Innere noch keine Flüssigkeit gedrungen ist. Die frühere Angabe von mir, daſs 24 stündiges Verweilen in der Lösung zu Zellschrumpfungen Veranlassung gäbe, kann ich nach wiederholten Prüfungen nicht aufrecht erhalten. Dadurch vergröſsert sich die Anwendungsmöglichkeit der Flüssigkeit. Auch kalkhaltige Organe können in der Pikrinsalpetersäure fixiert werden, da die Salpetersäure mit dem Kalk keine unlöslichen Niederschläge giebt. Aus der Säure kommen die Objekte *direkt* in 70 % Alkohol und werden langsam erhärtet. Anwendung von Wasser nach dem Fixieren ist durchaus zu vermeiden, aus den Gründen, welche in No. 29 dieses Kapitels bei Besprechung der reinen Pikrinsäure entwickelt wurden.

Da die zur Benützung kommende Pikrinsäure hier sehr konzentriert ist, so kann dieselbe nicht vollständig aus den Geweben durch die Nachbehandlung in Alkohol entfernt werden. Das ist im allgemeinen kein Nachteil; nur wenn man zur Färbung sehr säureempfindliche Substanzen verwenden muſs, dürfte es angezeigt scheinen, eine vollständige Entfärbung herbeizuführen. Man kann dieselbe auf zwei Wegen erreichen, entweder indem man nach Jelinek Lithion carbonicum zusetzt (cfr. No. 29 dieses Kapitels) oder indem man bei Einzelfärbung die aufgeklebten Schnitte etwa 24 Stunden in 70 % Alkohol läſst, bevor

man den Farbstoff anwendet. Ich kann die Pikrinsalpetersäure nur *auf das wärmste* empfehlen, *sie ist eine der besten und*, richtig gehandhabt, eine der *zuverlässigsten Fixierungsflüssigkeiten*, die wir besitzen. Sie ist *für alle Organe der erwachsenen Wirbeltiere, für Wirbellose und für Embryonen verwendbar*, ja bei *Nematoden* ist sie die einzige Flüssigkeit, in welcher diese Würmer ihren prallen Habitus beibehalten. Das Färbungsvermögen ist für alle Farbstoffe ein gutes.

36) **Chrompikrinsalpetersäure.** Seit einiger Zeit *verwende ich* vielfach, namentlich bei *Zellteilungsstudien*, folgende Mischung: 4 Teile 1 % Chromsäure und 1 Teil Pikrinsalpetersäure. Die Farbe ist die der reinen Chromsäure mit einem Stich ins Gelbe. Die Objekte (Salamanderhoden oder Salamanderembryonen) bleiben 24 Stunden in der Mischung und werden dann direkt in 70 % Alkohol übertragen. Auch hier kann man, wenn es nötig sein sollte, die vollständige Vertreibung des Pikrins nach den Angaben Jelineks vornehmen.

37) **Pikrinosmiumsalpetersäure.** Zur Fixierung sehr *zarter Gewebe* habe *ich* mit Erfolg eine Kombination versucht, die ich jetzt in folgender Weise herstelle: 6 Vol. Pikrinsalpetersäure werden mit 1 Vol. 2 % Osmiumsäure vermischt. Die Flüssigkeit kann in einer hellen Flasche aufbewahrt werden und hält sich sehr lange. In derselben verweilen die Objekte $^1/_2$—3 Stunden. Es wird dann direkt in 70 % Alkohol übergeführt, der in den ersten Tagen mehrere Male gewechselt werden mufs, dann kommt 80 %, endlich 90 % Alkohol.

38) **Pikrinessigosmiumsäure.** Vom Rath mischt 1000 ccm. wässriger konzentrierter Pikrinsäurelösung, 3 ccm. Eisessig und löst darin 1 gr. Osmiumsäure. Die Mischung wird zum Fixieren von *Ovarien der Ascaris megalocephala* empfohlen. Aus der Flüssigkeit mufs direkt in 70 % Alkohol übertragen werden.

39) **Konzentrierte wässrige Sublimatlösung.** Dieselbe gehört mit zu den besten Fixierungsmitteln, die wir besitzen. Für gewöhnliche Zwecke stelle ich mir die Lösung nach dem Vorgange von R. Heidenhain so dar, dafs ich in eine 0,5 % Kochsalzlösung so viel Sublimat bringe, als sich während des Kochens lösen will. Die heifse Flüssigkeit ist trübe, man läfst sie langsam erkalten. Jetzt scheiden sich Sublimatkrystalle in Form langer Nadeln aus, während die Flüssigkeit klar wird. Der für die tierischen Gewebe unschädliche Kochsalzzusatz ist darum notwendig, weil sich durch denselben mehr Sublimat löst, als ohne denselben. Die Lösung wird in eine dunkle oder an einem dunklen Orte aufzubewahrende Flasche abgegossen, weil im Lichte leicht eine Zersetzung des Sublimats eintritt. In diese konzentrierte Lösung kommt das Objekt auf 10 Minuten bis zu 24 Stunden. Sublimat dringt, weil es die peripheren Organpartieen zu schnellster Gerinnung bringt, schwer ein, deswegen müssen die einzulegenden Stücke recht klein gewählt werden. Die Beendigung der Fixierung kann man an kleineren Embryonen daran erkennen, dafs dieselben ganz weifs und undurchsichtig geworden sind. Bei Sublimat und sublimathaltigen Lösungen dürfen keine Metallinstrumente verwandt werden, weil dieselben durch das Quecksilber sich schwärzen.

Nach dem Fixieren wird das Objekt *direkt* in 70 % Alkohol übertragen; Auswaschen in Wasser wirkt nach meinen Erfahrungen geradezu schädlich. Dem 70 % Alkohol wird so viel offizinelle Jodtinktur

zugesetzt, dafs er die Farbe des Portweins annimmt. Das Jod verbindet sich mit dem in den Geweben zurückgebliebenen Sublimat und entfernt so dasselbe aus dem Objekte. Die Abgabe von Quecksilber an das Jod dokumentiert sich durch das Eintreten einer Entfärbung des Alkohols, die auf dem Boden des Glases, in welchem das Präparat sich befindet, zuerst auftritt. Man schüttelt in solchem Falle um, damit auch die höheren Alkoholschichten mit dem Präparate in Berührung kommen, und man erneuert den Jodalkohol so lange, bis keine Entfärbung mehr eintritt. Die häufig sich zeigende leichte Bräunung des fixierten Objektes hat nichts zu sagen, da das wenige Jod, welches in die Gewebe eingedrungen ist, während der nachfolgenden, langsam vorzunehmenden Erhärtung durch den Alkohol wieder entfernt wird. Zuweilen passiert es, dafs das Jod mit dem Quecksilber sich zu rotem Quecksilberjodid verbindet und in kleinen Krystallen auf dem Präparate niederschlägt. Zur Entfernung dieser Verbindung thut man nach der Empfehlung von P. Mayer einige Krystalle von Jodkalium in den Alkohol, wodurch sich das Quecksilberjodid auflöst. Das Sublimat ist für *alle Gewebe und Organe* zu gebrauchen, besonders zweckmäfsig ist es bei *Embryonen*. Nur beim Verdauungsapparate der Crustaceen hat es mich im Stich gelassen; für diese Organe ist Flemming'sche Lösung und Pikrinsalpetersäure vorzuziehen.

Das Färbungsvermögen in Sublimat fixierter Objekte ist für alle Farbstoffe ein gutes.

40) **Sublimat-Eisessig, Lang'sche Flüssigkeit.** Nach Davidoff nimmt man 3 Teile gesättigter wässriger Sublimatlösung und 1 Teil Eisessig. In der Mischung bleiben die Objekte $^1/_2$—1 Stunde, werden dann 5 bis 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, auf 1 Stunde in Alkohol von 40 % gebracht, dann in 60 %, 70 % etc. Für *sehr dotterreiche Eier*, besonders von *zusammengesetzten Ascidien*, zu empfehlen. Etwaige Sublimatkrystalle können aus den Schnitten durch Jodalkohol entfernt werden.

41) **Sublimat-Essigsäure.** Lo Bianco empfiehlt 100 ccm. konzentrierter wässriger Sublimatlösung mit 50 ccm. konzentrierter Essigsäure zu mischen. Nachbehandlung wie nach Fixierung in reinem Sublimat.

42) **Sublimat-Salpetersäure.** Frenzel setzt zu gesättigter wässriger Sublimatlösung das gleiche Quantum Alkohol absolutus und giebt auf je 1 ccm. der Mischung einen Tropfen offizineller Salpetersäure zu. Nach der Fixierung, deren Dauer dem Charakter des Objektes anzupassen ist, wird direkt in 70 % Alkohol übertragen und langsam gehärtet. Der Vorteil des Salpetersäurezusatzes besteht darin, dafs sich in dem fixierten Objekte keine Sublimatniederschläge bilden, ein Auswaschen mit Jodalkohol also unnötig ist. Für *alle Organe*, besonders aber für *Insektenfixierung* geeignet.

43) **Sublimat-Chromsäure.** Lo Bianco mischt 100 ccm. gesättigter wässriger Sublimatlösung mit 50 ccm. 1 % Chromsäurelösung. In der Mischung bleiben die Objekte 24 Stunden und länger, werden dann in destilliertem Wasser ausgewaschen, in 70 % Jodalkohol übertragen und langsam nachgehärtet. Für die verschiedensten Organe geeignet.

44) **Sublimat-Pikrinsäure.** Nach Rabl (ich folge hier den Angaben

von Jelinek) mischt man gleiche Teile gesättigter wässriger Sublimatlösung (die Auflösung hat in Kochsalzwasser zu geschehen) und gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung. Die sehr klein zu wählenden Objekte kommen auf 1—24 Stunden in die Mischung und sind öfters in derselben zu bewegen. Man kann auch zu je 100 ccm. 5 ccm. Eisessig oder Ameisensäure zusetzen. Nach der Fixierung wird *direkt* in 70 % Alkohol übertragen, der allmählich durch stärker konzentrierten ersetzt wird. Für die gute Fixierung und Nachhärtung ist das häufige Bewegen der Objekte in der betreffenden Flüssigkeit notwendig. Für *alle Organe* und für *Embryonen* geeignet.

45) **Mann'sche Lösung.** Man mischt nach Mann von gesättigter wässriger Sublimatlösung (in Kochsalz gesättigt) 100 ccm. und löst in denselben 1 gr. Pikrinsäure und 2 gr. Tannin. Die Objekte verbleiben 24 Stunden in der Lösung und werden *direkt* in 70 % Alkohol, dem etwas Jodtinktur beigesetzt ist, übertragen. Dann, wenn nämlich keine Entfärbung des Jods mehr eintritt, wird langsam in Alkohol gehärtet. Ich habe gefunden, dafs die Randpartieen so fixierter Objekte gelber und härter sind als das Innere, sie sind offenbar stärker gegerbt. Für *Alles* geeignet.

46) **Sublimat-Kupfersulfat.** Lo Bianco mischt 100 ccm. 10 % Kupfersulfatlösung mit 10 ccm. konzentrierter wässriger Sublimatlösung. Nach der Fixierung, deren Dauer sich nicht bestimmen läfst, ist in Wasser auszuwaschen und in Alkohol von allmählich steigender Konzentration zu erhärten. Für *Siphonophoren* besonders geeignet.

47) **0,1 % Palladiumchlorür.** Nach F. E. Schulze ist, um das Salz in destilliertem Wasser zu lösen, ein Minimum von Salzsäure erforderlich. Kleine Objekte kommen für 2—3 Tage oder für noch längere Zeit in die Lösung; sie werden darin schnittfähig und färben sich gelblich. Das Chlorpalladium ist besonders *zum Nachweis glatter und quergestreifter Muskeln* geeignet, die darin ein strohgelbes Kolorit annehmen. Es erhält gut Zellstrukturen. Nachfärben in Karmin.

48) **Platinchloridlösung** $^1/_{10}$ %, $^1/_8$ %, $^1/_3$ %. Rabl empfiehlt zum Studium von *Zellteilungserscheinungen* Salamanderlarven in die $^1/_{10}$ % oder $^1/_8$ % Lösung einzubringen, nach 24stündigem Verweilen in derselben gut auszuwaschen und langsam in Alkohol zu erhärten. Die zu untersuchenden Partieen werden in Hämatoxylin oder Cochenille gefärbt und in Methylalkohol beobachtet. Nach Löwitt ist die 0,1 % Lösung sehr geeignet zum Studium der *Blutbildung*.

Die $^1/_3$ % Lösung wird von Rabl zur Fixierung von *Embryonen* empfohlen; die Objekte verbeiben 24 Stunden in derselben, werden sorgfältig in Wasser ausgewaschen und langsam erhärtet.

49) **Merkel'sche Flüssigkeit.** Nach Merkel mischt man 100 ccm. 1 % Platinchloridlösung, 100 ccm. 1 % Chromsäure und 600 ccm. Wasser. Die Objekte verweilen in der Lösung je nach ihrer Beschaffenheit einige Stunden bis mehrere Tage. Sie werden dann direkt in 70 % Alkohol übertragen und langsam erhärtet. Erhält gut *Kern- und Plasmastrukturen*.

50) **Hermann'sche Flüssigkeit.** Hermann stellt zur Fixierung von *Zellteilungen* Gemische aus Platinchlorid, Osmium und Eisessig her,

die je nach dem Objekte eine verschiedene Zusammensetzung haben. Das *erste Gemisch* ist für *Salamandra* bestimmt und hat folgende Zusammensetzung: 1 % Platinchloridlösung 15 Teile, 2% Osmiumsäurelösung 2 Teile, Eisessig 1 Teil. Das *zweite Gemisch* dient zur Fixierung von *Säugetierorganen* und besteht aus: 1 % Platinchloridlösung 15 Teile, 2 % Osmiumsäurelösung 4 Teile, Eisessig 1 Teil. In den Gemischen bleiben die Objekte, die klein gewählt werden müssen, 1—2 Tage, werden dann sorgfältig in Wasser ausgewaschen und langsam erhärtet.

51) **Chromsäure und molybdänsaures Ammoniak.** Altmann fixiert in $2^1/_2$ % molybdänsaurem Ammoniak, dem $^1/_4$ % Chromsäure zugesetzt ist. Hierin bleiben die Objekte 24 Stunden und kommen dann direkt in Alkohol. Zum Studium der *Granula des ruhenden Kerns.*

Anhang zu Kapitel II und III.

1) **Lysol.** Reinke hat in jüngster Zeit *Lysol* zur Herstellung von *Mazerationspräparaten* empfohlen. Man nimmt entweder eine 10 % Lösung des Mittels in destilliertem Wasser oder man mischt 10 Teile Lysol, 60 Teile destillierten Wassers und 30 Teile absoluten Alkohols. Zu starker Aufhellung verwendet man eine Mischung von 10 Teilen Lysol, 50 Teilen Aqua destillata, 30 Teilen Alkohol und 10 Teilen Glycerin.

In den Gemischen werden die Teile sehr schnell mazeriert, sodass es möglich ist, schneller als bisher Isolationspräparate herzustellen. Doch werden sehr leicht auch Kunstprodukte hervorgerufen, sodass eine kritiklose Verwertung der Befunde zu Irrtümern führen mufs. Die Untersuchungen sind z. Z. noch nicht spruchreif, immerhin aber dürfte sich die Prüfung des Mittels empfehlen.

2) **Formol (Formalin).** Das *Formol* oder *Formalin* stellt eine 40 % Lösung von *Formaldehyd* dar, welche von der chemischen Fabrik von Meister Lucius und Brüning in *Höchst* geliefert wird. Nach der Angabe von Blum ist eine Lösung des Formols in Wasser (1 Formol : 10 Aqua destillata) ausgezeichnet zur *Konservierung* ganzer Tiere und zur *Fixierung* zu histiologischen Zwecken. Um fixierte Objekte schneiden zu können, mufs das Formol durch Alkohol ersetzt werden. Die Erfahrungen, die mit diesem Mittel gemacht sind, sind noch zu wenig zahlreich, um ein Urteil über dessen Verwendbarkeit zu mikroskopischen Studien zu gestatten: eine Prüfung ist aber zu empfehlen.

Kap. IV. Entkalken und Entfärben.

a) **Entkalken.** Um die Kalksalze, die manche Gewebe und Organe enthalten, entfernen zu können und so die Objekte zur Herstellung feiner Schnitte herzurichten, sind verschiedene Methoden angegeben worden, die jetzt aufgezählt werden sollen. Vorher aber ist *allgemein* zu bemerken, dafs die Objekte vor der Entkalkung fixiert und wenn möglich erhärtet sein sollen. Die Entkalkung ist eine sehr eingreifende und nicht immer ungefährliche Prozedur, die aber nicht umgangen werden kann. Durch das Freiwerden der Kohlensäure und dann, nach vorheriger Erhärtung, durch das sehr lange Einbringen

der Objekte in wässrige Lösungen können beträchtliche Zerstörungen und Veränderungen hervorgerufen werden. Es ist daher gut, den Prozess möglichst zu beschleunigen, also *schnell zu entkalken*, soweit das ohne zu starke Eingriffe möglich ist, um das Objekt möglichst bald wieder in Alkohol zu überführen. Den Fortgang der Entkalkung prüft man dadurch, dafs man von Zeit zu Zeit mit einer Nadelspitze an einer für die Untersuchung gleichgiltigen Stelle einen Eindruck zu machen versucht; ist der Kalk entfernt, dann wird das Gewebe weich und gibt dem Nadeldruck nach.

1) 3 %—9 % **Salpetersäure.** Man bringt die Objekte in ein sehr grofses Quantum der Säure, deren Konzentrationsgrad sich nach der Härte des zu entkalkenden Objektes zu richten hat. Statt die Säure blofs mit destilliertem Wasser zu verdünnen, thut man besser, sie in eine *konzentrierte Kochsalzlösung* einzubringen. Man mufs bei länger dauernder Entkalkung *die Flüssigkeit mindestens alle 3 Tage wechseln.* Nach vollendeter Entkalkung, die durch Prüfen mit einer Nadelspitze konstatiert wird, wie oben angegeben wurde, ist sorgfältig in destilliertem Wasser auszuwaschen und langsam in Alkohol von steigender Konzentration zu erhärten.

2) **Ebner's Entkalkungsflüssigkeit.** Die Objekte werden in eine 10 %—15 % Kochsalzlösung gebracht, welche 1 %—3 % reine Salzsäure enthält. Man wäscht nach der Entkalkung gut aus und härtet langsam in Alkohol.

3) **Chlorpalladiumsalzsäure.** Nach Waldeyer wird zu einer 1 % Salzsäure soviel 1 % Chlorpalladiumlösung hinzugesetzt, dafs 100 ccm. des Gemisches 0,001 % Chlorpalladium enthalten. Sorgfältiges Auswaschen und langsames Erhärten.

4) **Chromsalpetersäure.** Katz empfiehlt zur Entkalkung der *Schnecke bei kleineren Säugetieren* folgende Mischung: Chromsäure 0,4 gr., Salpetersäure 5 ccm., Aqua destillata 100 ccm.; bei dem gleichen Organ vom *Menschen* mufs eine 10 % Chromsäure genommen werden. Die Entkalkung ist bei kleinen Tieren nach circa 8 Tagen, bei menschlichen Felsenbeinen nach frühestens 3 Wochen beendet. Sorgfältiges Auswaschen in Wasser und langsames Erhärten in Alkohol.

5) **Chromsalzsäurepalladiumchlorür.** Zur Entkalkung *besonders harter Knochen* empfiehlt Katz, wie er mir brieflich mitteilt, folgendes Gemisch: Chromsäure 0,4 gr., Salzsäure 10 ccm., Aqua destillata 100 ccm., dazu etwa 1 Efslöffel einer $^1/_2$ % Chlorpalladiumlösung. Sorgfältiges Auswaschen, langsames Erhärten.

6) **Phloroglucinsalzsäure.** Nach Ferreri mufs man das *Labyrinth des Menschen* in folgender Mischung während 30—40 Tagen entkalken: Phloroglucin 1,0, Wasser 100,0, Salzsäure 10,0. Die Mischung wird in der Wärme gelöst und nach dem Erkalten werden ihr 200 ccm. 70 % Alkohol zugefügt. Die Entkalkung wird bei Zimmertemperatur vorgenommen, die Flüssigkeit mindestens alle Wochen gewechselt. Nach beendeter Entkalkung wird in 70 % Alkohol so lange ausgewaschen, bis keine saure Reaktion mehr da ist.

b) **Entfärben.** Es ist zuweilen notwendig, aus Präparaten, die ein sehr intensiv dunkles Pigment haben, dieses zu entfernen, um über-

haupt einen Einblick in die Struktur des Objektes zu gewinnen. Ebenso mufs man zu dunkel gewordene Objekte (Gold-, Osmiumpräparate) zu entfärben versuchen. Die folgenden drei Methoden dienen diesen Absichten, und zwar die ersten beiden nur der Entfernung des Pigmentes, die dritte ist nach beiden Richtungen verwendbar.

7) **Grenacher's Entfärbungsflüssigkeit.** Um das intensiv dunkle *Pigment aus den Augen wirbelloser Tiere* zu entfernen, hat Grenacher folgende Mischung angegeben: 1 Teil Glycerin, 2 Teile Alkohol von 80 % und 2 %—3 % reiner Salzsäure. Man kann entweder Schnitte oder ganze Organe hierin entfärben, mufs aber den Entfärbungsvorgang sorgfältig überwachen. Ist das Pigment gelöst, so ist das Präparat aus der Flüssigkeit sofort zu entfernen und in 80 % Alkohol sorgfältig abzuspülen.

8) **Alkoholische Natronlauge.** Das *Pigment*, welches *im Mantelrande der Muscheln* und in den sich hier findenden Sinnesorganen vorkommt, widersteht der Einwirkung der Säure in Grenacher's Gemisch vollständig; noch nach monatelangem Liegen in jener Flüssigkeit ist es unverändert. *Ich* habe zu seiner Entfernung ganze Organteile oder Schnitte in etwa 15—20 ccm. Alkohol von 96 % gebracht, dem ich 3—9 Tropfen offizineller Natronlauge zugefügt hatte. Die Entfärbung war in kürzester Frist bewirkt, ohne dafs die zelligen Elemente des betreffenden Objektes gelitten hatten. Ich kann daher diesen alkalischen Alkohol für alle die Objekte empfehlen, die ein *säurebeständiges* Pigment haben. Aus dem alkalischen Alkohol wird sofort in neutralen Alkohol von 96 % übergeführt.

9) **Entfärbung mittels Chlordämpfen.** Nach Paul Mayer verfährt man zur Entfärbung *zu dunkel gewordener Osmiumpräparate* folgendermafsen: In ein mit Alkohol gefülltes Glas, in welchem sich das zu dunkle Präparat befindet, werden Krystalle von Kali chloricum gebracht und dazu etwas Salzsäure gethan, sodafs ein etwa 1 % salzsaurer Alkohol entsteht; die Flasche ist wohl zu verschliefsen. Jetzt entwickeln sich Chlordämpfe, welche das Präparat ausbleichen. Man mufs den Prozefs sehr genau überwachen, damit nicht die Einwirkung des Chlors eine zu intensive wird. Aus der Flüssigkeit entnommene Präparate dürfen nicht ausgewaschen werden, sondern kommen direkt in Alkohol. Diese histiologisch wohl nicht ganz ungefährliche Methode ist auch für *Pigment* verwendbar.

Kap. V. Die Methoden der Einbettung.

Die Objekte, die man einer histiologischen Analyse unterwerfen will, sind also fixiert und erhärtet; um sie weiter studieren zu können, mufs man nunmehr von ihnen *feine Schnitte* anfertigen. Dies kann auf zweierlei Art geschehen; entweder man schneidet ohne weiteres aus freier Hand mit einem gewöhnlichen scharfen Rasiermesser oder man durchtränkt die Objekte in bestimmter Weise mit gewissen Substanzen und schneidet sie dann mit einem Instrumente, dem Mikrotom. Bei dem Schneiden aus freier Hand ist es nicht gut, wenn man das Untersuchungsobjekt ohne Hülle lässt; meistens nämlich wird in absolutem Alkohol gehärtet, der, wenn keine spezielle Vorsorge dagegen getroffen

wird, sehr schnell verdunstet, infolge wovon eine Vertrocknung des Präparates eintreten mufs. Zu Verhütung dessen umhüllt man das Material in geeigneter Weise und schneidet es mit der Umhüllung. Man sagt dann: das Präparat wird *eingeklemmt*. Durchtränkt man es mit bestimmten Substanzen, um es mit dem Mikrotom zu schneiden, so wird das Material *eingebettet*. Zwischen Einklemmen und Einbetten in der Mitte steht das *Umranden*.

Keine von diesen drei Arten ist notwendig, wenn es sich um Material handelt, das in MÜLLER'scher Flüssigkeit erhärtet worden ist. Hier braucht man, wie dies in Kapitel III unter No. 8 bereits auseinander gesetzt wurde, nicht nachzuhärten, hier ist also die Verdunstung, welche beim Alkohol stets eine rapide ist, eine sehr viel langsamere und daher eine Umhüllung nicht unbedingt erforderlich. Doch wird man gut thun, eine solche selbst beim Zentralnervensystem vorzunehmen, weil nach der Umhüllung ein schonenderes und sichereres Schneiden möglich ist, als ohne dieselbe. Die Behandlung des zu schneidenden Materiales ist *schonender*, weil dasselbe nicht mit den Fingern festgehalten und daher nicht gequetscht zu werden braucht, denn ein wenn auch geringes Quetschen läfst sich beim Halten zwischen zwei Fingern nicht ganz vermeiden. Das Schneiden ist *sicherer*, weil das Klemmmaterial einen Stützpunkt für die Führung des Messers abgibt.

In welcher Weise man mit der freien Hand oder mit dem Mikrotom schneidet, soll im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben werden, hier will ich nur die Methoden der *Einklemmung*, *Umrandung* und *Einbettung* auseinandersetzen. Ich führe auch nur diejenigen an, welche wirklich brauchbar sind, während ich eine ganze Anzahl von Methoden der Einbettung (z. B. Transparentseife, Gummiglycerin) übergehe. Dieselben sind mit Recht wegen ihrer Unzuverlässigkeit und Gefährlichkeit verlassen worden und dürfen nur noch auf ein historisches Interesse Anspruch machen.

a) **Einklemmen.** 1) **Einklemmen in Leber.** Die Leber des Rindes und die sogenannte Speckleber, die bei vielen Krankheiten des Menschen vorkommt, erlangen durch Härtung in starkem Alkohol eine sehr gleichmäfsige Konsistenz, welche das Anfertigen von Schnitten derselben aus freier Hand ungemein erleichtert. Ein Stückchen solcher Klemmleber spaltet man durch einen Schnitt mit einem scharfen Skalpell und steckt in den Spalt das zu schneidende Objekt. Die Vertrocknung, welche an den von den Fingern gehaltenen Partieen der Leber eintritt, ist belanglos, da es sich ja nicht um das Studium des Einklemmungsmateriales handelt. Man schneidet zunächst die Leber und dann im selben Zuge das Präparat, das man mit etwas Alkohol vom Messer abspült. Bei einiger Übung und einiger Geschicklichkeit lernt man bald hinreichend dünne Schnitte anfertigen, welche zur Orientierung über den Bau der Organe für den Anfänger völlig genügen. Für Erkennung feinerer Einzelheiten aber und zu eingehenderem Studium ist diese Methode allerdings nicht ausreichend.

2) **Einklemmen in Hollundermark.** Man nimmt ein Stückchen trocknes Hollundermark und macht in dasselbe ein so grosses Loch, dafs das zu schneidende Objekt bequem hineinpafst. In das Loch wird das Objekt gesteckt und mit dem Hollundermark für einige Minuten in Wasser geworfen. Das Objekt steckt jetzt infolge der Quellung des Hollundermarkes fest und kann unter Alkohol geschnitten werden.

Mir scheint diese Methode weniger ungefährlich zu sein als das Einklemmen in Leber, denn offenbar mufs das Objekt durch die Quellung des Hollundermarks gepreſst werden.

b) **Umranden.** Will man nicht aus freier Hand schneiden, sondern sich des Mikrotoms bedienen, das Objekt aber nicht der umständlichen Prozedur der Einbettung unterwerfen, so kann man folgendermafsen verfahren. Man macht etwas Paraffin oder Wallrat auf einem erwärmten Messer oder Metallspatel flüssig und tropft dasselbe auf das zu schneidende Objekt. Sofort wird die Fettmasse (Paraffin, Wallrat) starr. Man fährt mit dieser Prozedur so lange fort, bis das ganze Objekt von Paraffin oder Wallrat umhüllt ist. Dann schmilzt man auf einen mit einer der beiden genannten vorher erwärmten und dadurch flüssig gemachten Substanzen bedeckten Holzklotz oder auf den Jung'schen mit Paraffin ausgegossenen Metallcylinder auf und klemmt in die Präparatenklammer des Mikrotoms ein. Es ist durchaus notwendig, dafs die das Objekt umgebende Wallrat- oder Paraffinschicht *sehr dünn* ist, es darf gewissermafsen nur *eine Kandierung* ausgeführt sein. Ist die Rinde zu dick, so bekommt man keine gleichmäfsigen Schnitte, da das Messer, wenn es in das Objekt kommt, infolge der weicheren Konsistenz desselben sich wirft. Es ist ferner sehr wichtig, dafs das Paraffin oder Wallrat *nicht zu heiss und nicht zu kalt* aufgetragen wird, da sonst die Rinde sehr leicht vom Präparate abspringt. Nach einiger Übung lernt man bald die genannten Fehler vermeiden und kann dadurch zu ganz instruktiven Schnitten gelangen.

c) **Einbetten.** Um ganze Gehirne oder Rückenmarke von Säugetieren in lückenlose Schnittserien zerlegen zu können, ist es am besten, falls man nicht das später zu erwähnende Celloidin oder Photoxylin anwenden will — und das ist namentlich bei pathologisch veränderten Objekten nicht immer angängig, weil die der Celloidineinbettung vorhergehende Alkoholbehandlung nach Ansicht der Gehirnpathologen Schrumpfungen in den Zellen hervorrufen soll —, sich eines Mikrotoms, des Cylindermikrotoms von Gudden zu bedienen. Dazu müssen aber vorher die Gehirne eingeschmolzen, oder richtiger umschmolzen werden und hierfür ist am besten geeignet die

3) **Gudden'sche Masse.** 12 Teile Stearin, 12 Teile Schweinefett und 1 Teil Wachs werden zusammen geschmolzen und heifs über das im Cylinder des Mikrotoms von Gudden befindliche, direkt aus der Müller'schen Lösung oder dem Kali bichromicum entnommene Präparat gegossen. Damit die Masse besser an dem Gehirn oder Rückenmark anhaftet, ist es nach dem Vorschlage von Forel vorteilhaft, das Objekt vorher eine Zeitlang in warmem Wasser zu erwärmen. Je nach dem Präparate ist sowohl die Temperatur der Masse wie die Wassererwärmung eine verschiedene; man kann den richtigen Grad nur durch Übung kennen lernen. Nach dem Erstarren retrahiert sich aber die Masse meistens von dem Metallcylinder, sodafs das Präparat bei der Messerführung wackelt. Zur Verhütung dieses Übelstandes kann man, wie Forel angibt, zwischen den Metallcylinder und das Präparat kleine Holzsplitter einkeilen. Auf die Dauer schaffen diese aber auch keine Hilfe, da sie bald locker werden. Besser ist es nach Anraten desselben Autors, das Präparat mit der es fest umgebenden Einbettungs-

masse aus dem Mikrotomcylinder herauszuziehen und in den letzteren entweder von neuem heifse Masse zu giefsen oder seine Wandung mit einer heifs hergestellten Mischung von Terpentin und Wachs zu bestreichen. Dann wird die Peripherie des Präparates rasch erwärmt und das Ganze schnell und sorgfältig in den Cylinder eingeschoben.

Weitaus die verbreitetsten Methoden sind die beiden folgenden; sie geben, wenn sie gut ausgeführt werden, sichere Resultate, ermöglichen die Herstellung dicker und sehr feiner Schnitte und gestatten, das Material in lückenlose Serien zu zerlegen. Diese Methoden sind die Einschmelzung in *Paraffin* und die Durchtränkung mit *Colloidin* und *Photoxylin*.

4) **Paraffineinschmelzung.** So ohne weiteres sind die dem 90 % Alkohol entnommenen Präparate nicht zur Einschmelzung geeignet. *Man mufs* vielmehr dieselben erst *völlig wasserfrei machen* und dann mit einer Flüssigkeit durchtränken, welche sich mit Paraffin mischt. Man bringt daher die Präparate aus dem 90 % auf 24—48 Stunden in 96 % und dann auf 24—48 in sehr viel absoluten Alkohol, den man sich selber in der in Kap. III unter No. 1 beschriebenen Weise hergestellt hat. Die Angabe der Zeitbestimmungen hat selbstverständlich nur einen relativen Wert; oft mufs die Entwässerung viel länger vorgenommen werden. *Man darf eben*, wie schon einmal bemerkt, *keinen Zeitmangel haben und nichts überhasten.*

Für kleine, zarte Objekte, die bei dem Transport aus dem einen Alkohol in den anderen leicht verletzt werden können, ist viel schonender und dabei absolut sicher in ihrem Endeffekt die *Entwässerung* in dem von F. E. Schulze angegebenen Entwässerungsapparate, dem sogenannten *Dialysator* vorzunehmen. Dieser Apparat besteht aus einer Flasche mit weitem Halse und zwei in einander und in den Hals der Flasche zu steckenden trichterartigen Einsätzen. Auf den Boden der Flasche kommt geglühtes Kupfersulfat, gefüllt wird sie mit 96 % Alkohol, dem das Kupfer jede Spur von Wasser entzieht. In den Hals der Flasche kommt der weitere der beiden trichterförmigen Einsätze, dessen eine dem Alkohol absolutus zugewandte Öffnung mit einem Blättchen dünnsten Papiers (Fliefspapier oder „Naglers Postverdrufs") verklebt ist. Das Verkleben geschieht, indem man den Rand des Trichters mit Eiweifslösung bestreicht, darauf das Papierstückchen legt und im Wärmeschrank bei etwa 60—62 ° C. das Eiweifs zur Gerinnung bringt. In den ersten Einsatz kommt der zweite engere, auf gleiche Weise verschlossene. In den ersten Einsatz giefst man 90 % oder 96 % Alkohol, in den zweiten engeren bringt man das Präparat in dem Alkohol, in welchem es aufbewahrt war. Zugedeckt wird mit einer Glasplatte. Nun beginnen durch die dünnen Papiere hindurch die Diffusionsströmungen in den Alkoholen der verschiedenen Grade, deren Resultat nach 24 Stunden das ist, dafs in allen drei in einander steckenden Gefäfsen sich absoluter Alkohol befindet. Die Verwässerung nämlich, welche durch die Diffussion der absolute Alkohol des Hauptgefässes erleidet, wird durch das geglühte Kupfersulfat, welches Wasser begierig aufnimmt, sofort wieder paralysiert.

Nun mufs nach geschehener Entwässerung der Alkohol durch eine mit dem Paraffin sich mischende Flüssigkeit verdrängt werden. Dies kann durch *Terpentin, Xylol* oder *Chloroform* geschehen. Auf jeden Fall mufs

das Objekt *völlig wasserfrei* sein, sonst dringen Terpentinöl oder Xylol nicht ein, während man mit dem Chloroform wolkige Trübungen erhält.

Nimmt man *Terpentinöl* oder *Xylol*, so bringt man das Präparat aus dem absoluten Alkohol in eine der beiden Flüssigkeiten und läfst es so lange in derselben, bis es durchsichtig geworden ist. Das erfordert beim Terpentin mehr Zeit als beim Xylol und dauert je nach der Dicke und der Durchdringungsfähigkeit des Materiales verschieden lange.

Anders verfährt man beim Gebrauche von *Chloroform*. Mittels einer Pipette bringt man vorsichtig auf den Boden des Glases, in welchem das Präparat in absolutem Alkohol, von dem ein Teil vorher abgegossen werden kann, sich befindet, Chloroform. Da dasselbe schwerer ist als der absolute Alkohol, so sinkt es zu Boden und Präparat und Alkohol werden dadurch in die Höhe gehoben, derart, dafs das Präparat an der deutlich sichtbaren Grenze beider Flüssigkeiten schwimmt. (Natürlich mufs man vom Chloroform ein solches Quantum nehmen, dafs das Präparat, wenn es in dasselbe hineingesunken ist, vollständig davon bedeckt wird.) Jetzt beginnen innerhalb des Präparates an den Stellen, welche auf der schwereren Flüssigkeit, i. e. dem Chloroform, aufruhen, Diffusionsströmungen, wodurch der Alkohol zum Teil verdrängt wird und an seine Stelle Chloroform tritt. Infolge dieses Ersatzes des einen Reagens durch das andere sinkt das Präparat zu Boden. Die Zeit, die zur Vollendung dieses Prozesses notwendig ist, ist eine ganz unbestimmbare, manchmal genügen wenige Stunden, manchmal dauert es einen Tag; von Einfluſs ist die Dicke des Präparates und die Temperatur in dem Laboratorium. Man nennt diese Methode, welche für andere Zwecke von F. E. Schulze angegeben wurde, die *Senkmethode*. Ist das Präparat auf den Boden des Glases herabgesunken, so mufs man vorsichtig beide Flüssigkeiten abgiefsen und dieselben durch ein grofses Quantum reinen Chloroforms ersetzen. In dem letzteren müssen die Objekte noch längere Zeit verweilen, damit sie sich vollständig mit Chloroform durchtränken. Denn nur in äusserst zartes Material ist das Chloroform völlig eingedrungen, meistens — *und das ist wohl zu beachten* — ist bei der Senkung nur die Peripherie chloroformiert, während im Innern des Objektes noch absoluter Alkohol vorhanden ist. Dieser mufs erst ganz verdrängt sein, ehe man weiter operieren kann, und das dauert *mindestens* 24 Stunden, oft aber mehrere Tage bis zu einer Woche und darüber. Namentlich Objekte, welche Knorpel oder entkalkten Knochen oder viel Muskelfasern enthalten oder eine epidermoidale Decke besitzen, durchtränken sich *sehr* schwer. Geht man hierbei zu schnell vor, so mifsglückt die Prozedur völlig, da die Präparate später im Paraffin bis zur Unkenntlichkeit schrumpfen oder sich gar nicht durchtränken. Auch eine Beschleunigung des Eindringens des Chloroforms durch Brüttemperatur ist entschieden zu widerraten, da auch dann später hochgradige Schrumpfung eintritt. Ich lasse fast alle Objekte — nur die kleinen Eier gewisser Evertebraten nicht — mindestens zwei Tage im reinen Chloroform, denn der lange Aufenthalt im Chloroform schadet gar nichts, wenn vorher nur gut fixiert und genügend entwässert wurde.

Auf diese Weise wird meines Erachtens *der Alkohol viel schonender verdrängt*, als wenn man die Präparate direkt in Terpentinöl oder Xylol bringt. Die Frage, welche der drei Flüssigkeiten — Terpentinöl, Xylol, Chloroform — vorzuziehen ist, kann ich daher nach meinen Er-

fahrungen nur dahin beantworten, *dafs das Chloroform die andern beiden,* weil es schonender eindringt und also für die Gewebsteile weniger Gefahren mit sich führt, *bedeutend übertrifft;* infolgedessen ist die Langsamkeit, mit der das Chloroform wirkt, ganz nebensächlich. Aufserdem greift das Chloroform das später zu benutzende Paraffin nicht an, während dies beim Terpentinöl und Xylol in mehr oder minder ausgedehntem Mafse der Fall ist, d. h. das Paraffin wird in den beiden letztgenannten Flüssigkeiten in seinem Schmelzpunkte herabgesetzt.

In reinem Chloroform werden die Objekte niemals durchsichtig und sinken selten unter; nur Osmiumpräparate und solche, die nicht völlig entkalken Knochen enthalten, fallen zu Boden.

Aus dem Terpentin, Xylol oder Chloroform werden die Präparate in eine Mischung von einer der Flüssigkeiten mit Paraffin übertragen, also in *Terpentinparaffin, Xylolparaffin* oder *Chloroformparaffin.* Man stellt eine solche Mischung derart her, dafs man von dem Paraffin, welches zur definitiven Einschmelzung bestimmt ist, sich soviel in eine mit einer der Flüssigkeiten gefüllte Schale schabt, dafs eine dicke Lösung entsteht. In Chloroform löst sich Paraffin nur in der Wärme, in der Kälte ist in dem Bodenteil des Gefässes das Chloroform, darüber das Paraffin. In ein Gefäfs mit einer solchen Mischung werden die Präparate mit einem Horn- oder Metallspatel auf den Boden gebracht. Jetzt kann man in doppelter Weise vorgehen. (Ich bemerke parenthetisch, *dafs die folgenden Angaben sich ausschliefslich auf Objekte beziehen, die mit Chloroform durchtränkt sind, da ich niemals mehr eine Durchtränkung mit Terpentinöl oder Xylol vornehme.*) Entweder man läfst die Objekte in dem Chloroformparaffin über Nacht stehen, wobei das Glasgefäfs nicht zugedeckt wird. Dadurch verdunstet ein Teil des Chloroforms. Den folgenden Tag setzt man das das Präparat enthaltende Gefäfs und das Gefäfs, in welchem das reine Paraffin sich befindet, das erstere offen, das letztere bedeckt, in einen sogenannten Wärmeschrank mit konstanter Temperatur oder auf das Wasserbad, welches von P. Mayer in Neapel angegeben wurde und durch Jung in Heidelberg zu beziehen ist. Man stellt die Gasflamme bei letzterem Apparate so ein, dafs das reine Paraffin etwa 4—5 Stunden Zeit zum Schmelzen braucht. Während dessen ist das Chloroform völlig oder fast völlig verdunstet, so dafs man in dem das Präparat enthaltenden Gefäfse nahezu reines Paraffin hat. Jetzt bringt man das Präparat mit einem erwärmten Metallspatel oder mit einer erwärmten Pinzette aus dem ersten in das zweite, das reine Paraffin enthaltende Gefäfs und läfst es darin, je nach seiner Konsistenz, 1—3 Stunden, zarte, kürzere, massige längere Zeit.

Oder aber man stellt das Gefäfs mit Chloroformparaffin, in welchem sich das einzuschmelzende Objekt befindet, sofort nach dem Einbringen des letzteren in das Chloroformparaffin, in einen Wärmeschrank, dessen Temperatur konstant auf 62° C. erhalten werden kann. In demselben bleibt gleichzeitig mit dem Gefäfse, welches das reine Paraffin enthält, das Chloroformparaffin über Nacht. Am folgenden Morgen ist sicher alles Chloroform verdunstet und man überträgt in derselben Weise wie vorhin und für die gleiche Zeit in reines Paraffin. Seit zwei Jahren verfahre ich bei allen meinen Untersuchungen auf die zuletzt beschriebene Weise und habe *niemals* einen Mifserfolg gehabt. *Die Durchtränkung mit dem Paraffin ist eine viel gleichmässigere,* als bei dem ersten Verfahren, und *eine Schädigung* auch der zartesten Objekte (z. B. Go-

naden von Medusen) *tritt nicht ein*, wenn nur vorher gut fixiert und erhärtet, gut entwässert und gut mit Chloroform durchtränkt wurde.

Sind die Präparate mit dem reinen Paraffin völlig durchzogen, *dann müssen sie* noch *eingeschmolzen werden.* Man benutzt dazu entweder *Metallwinkel*, sogenannte Paraffinrähmchen, wie sie Jung in Heidelberg nach den Angaben der Neapler Station liefert, oder *Glaswinkel*, wie sie F. E. Schulze angegeben hat, oder endlich man verfertigt sich ein *Papierkästchen.* Die *Metallwinkel* setzt man auf eine Platte von Spiegelglas, die *Glaswinkel* auf eine dünne Platte von Zinn. Platte und Winkel werden mit etwas Glycerin befeuchtet; letztere müssen gut schliefsen und werden aneinander so verschoben, dafs der von ihnen begrenzte Raum gröfser ist als das einzuschmelzende Objekt. *Ein Papierkästchen stellt man sich auf folgende Weise her:* Man schneidet sich ein Stückchen Schreibpapier in Gestalt eines Rechtecks zurecht und knifft zuerst die beiden Langseiten etwa 1 cm., dann, nachdem man jene aufgeklappt, die beiden Kurzseiten etwa 2 cm. ein, so dafs ein rechteckiges centrales Feld übrig bleibt, das an Gröfse das Präparat mindestens um das Doppelte übertrifft. Dann legt man die eine Langseite in ihrem Kniff um und biegt die beiden Ecken nach hinten so zurück, dafs die Kniffe der Langseite die Kniffe der Kurzseite decken. Ebenso verfährt man mit der anderen Langseite. Nun richtet man die eine Kurzseite in ihrem Kniff hoch, biegt erst auf der einen, dann auf der anderen Seite das zwischen ihr und der Langseite sich zeigende Papierohr nach aufsen um, schlägt den überstehenden Teil der Kurzseite zurück, damit die beiden Ohren festgehalten werden, und verfährt in gleicher Weise mit der anderen Kurzseite. Diese Beschreibung läfst die kleine Manipulation etwas schwieriger erscheinen, als sie in der That ist; hat man aber etwa zwei bis drei Versuche in der angegebenen Weise angestellt, so wird man sich mit Leichtigkeit Papierkästchen von grofser Regelmäfsigkeit und beliebigem Raumgehalte anfertigen können. *Ich ziehe die Kästchen den Winkeln vor*, weil sie erstens billiger als diese und dann weil sie absolut dicht sind, was bei den Winkeln nicht immer der Fall ist. Die Kästchen stellt man auf eine dünne Zinnplatte, auf der sich etwas geschmolzenes Paraffin befindet; mit dem Paraffin durchtränkt sich der Boden des Kästchens und dieses haftet dann beim Erkalten fest an der Metallplatte.

Will man nun *einschmelzen*, so legt man die Metallplatte — ich benutze nur eine solche, da Spiegelglas leicht springt — auf einen metallenen Dreifufs, wie er in jedem Laboratorium vorhanden ist oder wenigstens vorhanden sein sollte; man erwärmt denselben und damit die Platte durch eine Spirituslampe, damit das Paraffin später flüssig bleibt. Auf der Platte arrangiert man die Winkel, bez. stellt man auf sie das Kästchen, gieſst in den freien Raum das geschmolzene reine Paraffin und bringt mit einem erwärmten Metallspatel das Präparat hinein. Dieses wird mit heifs gemachten Nadeln orientiert, d. h. so geordnet, dafs es die für die gewünschte Schnittrichtung angemessene Lagerung hat. Die Orientierung ist gleichgiltig, wenn es sich um ein in allen seinen Teilen gleichmäfsiges Organ handelt, z. B. um ein Stück Leber, wichtig aber ganz insbesondere für embryologisches Material. Die Orientierung mufs schnell und vorsichtig geschehen, damit das Paraffin sich nicht abkühlt. Hat man orientiert, so hebt man die warme Platte (ohne sich die Finger zu verbrennen) mit den Winkeln oder dem Kästchen vorsichtig, um die Lagerung des Präparates nicht

zu verändern, in die Höhe (bei dem Neapler Wasserbade ist dies in sehr sinnreicher und einfacher Weise vermieden) und bringt sie in eine Schüssel mit kaltem Wasser. Hier wird sie soweit eingetaucht, dafs das Kästchen bezw. die Winkel bis zu ihrer halben Höhe im Wasser stehen. Man mufs nun so lange warten, bis sich auf der ganzen Oberfläche des geschmolzenen Paraffins eine gleichmässige dünne Haut gebildet hat. Dann taucht man vorsichtig tiefer, bis das Wasser an einer Ecke langsam in den Raum des Kästchens oder der Winkel hineingelaufen ist. Dadurch wird die Oberfläche hart; nun wirft man das Ganze in das kalte Wasser. Nach 10 Minuten ist die Masse soweit erstarrt, dafs man das Papierkästchen — und nur bei diesem ist die folgende Manipulation notwendig — herausnehmen und entfernen kann; den Paraffinblock legt man wieder ins Wasser zurück und beschwert ihn, damit er nicht schwimmt, mit der Platte. Es ist das darum erforderlich, weil nach zu langem Verweilen im Wasser das Papier sich nicht mehr glatt vom Paraffinblock abziehen läfst. Im allgemeinen kann man sagen, dafs zum vollständigen Hartwerden des Paraffins höchstens $^1/_2$ Stunde erforderlich ist; ein äusseres Kennzeichen dafür ist bei Anwendung der Winkel dadurch gegeben, dafs dieselben sich leicht vom Paraffinblock und dieser von der Platte ablösen.

Die schnelle, in den vorstehenden Zeilen geschilderte Abkühlung des Paraffins ist notwendig, weil bei langsamer Abkühlung desselben Luftblasen in ihm entstehen und es infolge davon beim Schneiden krümelt.

Um die verschiedenen Paraffinblocks, die man herstellt, und damit auch das verschiedene Material, wenn solches nicht sofort und auf einmal verbraucht werden soll, gut unterscheiden zu können, empfiehlt es sich, *die Blocks zu bezeichnen.* Es geschieht dies am besten so, dafs man auf einen schmalen Papierstreifen kurz den Namen des Objekts und die Fixierung aufschreibt, den Papierstreifen an einer Ecke in das geschmolzene, im Kästchen (Winkel) befindliche Paraffin eintaucht und mit dem Präparate einschmilzt.

Welche Sorte von Paraffin soll man nun wählen? Vielfach findet man in den Lehrbüchern der Histiologie und den Handbüchern der histiologischen Technik die Angabe, man solle ein hartes Paraffin nehmen und dasselbe durch Zusatz von sogenanntem flüssigen Paraffinöl, von fadenziehendem Paraffin, dessen Schmelzpunkt bei circa 40 ° C. liegt, oder von Vaselin in seinem Schmelzpunkte so herabdrücken, dafs dieser 50 ° C. nicht übersteigt. Ich kann diese Angabe nicht gut begreifen. Paraffin von einem derartigen Schmelzpunkte schneidet sich sehr schlecht, *weil es zu fett ist;* die Schnitte kleben am Messer fest, reifsen infolgedessen häufig ein und sind dann natürlich wertlos. Will man gar eine gröfsere Schnittserie anfertigen, so können diese Eigenschaften des Paraffins einen geradezu zur Verzweiflung bringen, weil durch sie die mechanische und ermüdende Arbeit des Schneidens ungemein verlangsamt wird.

Man mufs sich bei der Auswahl der Einbettungsmethode klar machen, wie dick die anzufertigenden Schnitte sein können und sein sollen. Als Mafseinheit gilt in der Histiologie *das Mikromillimeter* oder *das Mikron.* Ein Mikron ist gleich 0,001 mm. und wird allgemein als 1 μ bezeichnet. Für manche Zwecke sind dicke Schnitte, für andere dünne erforderlich. Die gröfste Dicke, die man beim Paraffin erstreben sollte, ist meines Erachtens 15 μ. Darüber hinaus soll man nicht gehen,

denn dickere sind gar nicht oder nur schwer mit den im nächsten Kapitel zu beschreibenden Methoden aufzukleben, sie haften nicht an der Unterlage, weil sie zu brüchig sind, und aufgeklebt müssen sie werden, da sie sonst bei den zur Beseitigung des Paraffins nötigen Manipulationen zerreissen. Mufs man dicker als 15 μ schneiden, so ist es vorteilhafter, sich der noch zu schildernden Celloidin- oder Photoxylinmethode zu bedienen. Nicht immer braucht man aber 15 μ dicke Schnitte, meistens mufs man im Mafse bedeutend heruntergehen, auf 10 μ, 7,5 μ, 5 μ bis 3 μ. (Die vielfach jetzt beliebte Verdünnung der Schnitte bis 1 μ halte ich für zwecklos, da man dadurch alles, Zellen und Kerne, zerschneidet und nie ein körperliches Bild zu sehen bekommt.) Nun kann man wohl Schnitte von 15 μ, allenfalls noch solche von 10 μ von einem Paraffin mit 50 ° C. Schmelzpunkt anfertigen, dünnere Schnitte lassen sich aber nicht herstellen. Wählt man dagegen ein Paraffin mit höher liegendem Schmelzpunkte, so kann man sowohl dünne als auch dicke Schnitte anfertigen. *Daher ist unter allen Umständen ein Paraffin mit hohem Schmelzpunkte, also ein hartes Paraffin, vorzuziehen. Ein solches Paraffin ist das von 56 ° – 58 ° C. Schmelzpunkt.* Es ist ratsam, den Wärmeschrank, dessen Temperatur durch einen Thermostaten konstant auf derselben Höhe erhalten werden kann, auf eine höhere Temperatur einzustellen als die des Schmelzpunktes des Paraffins, also auf etwa 62 °—63 °C. Hat die Luft im Wärmeschrank gerade nur die Temperatur 56 °—58 °, dann gerinnt sogleich bei der geringsten Abkühlung, wie sie z. B durch das Öffnen der Schrankthür hervorgebracht wird, das Paraffin.

Dem Einwande möchte ich noch begegnen, als ob der hohe Schmelzpunkt des Paraffins, also die hohe Temperatur, in die das Präparat hineinkommt, dem letzteren schädlich sein könnte. Dieser Einwand ist ganz und gar hinfällig. Ein gut fixiertes und gut und vorsichtig gehärtetes Präparat *muss* eine Temperatur, wie sie oben angegeben wurde, aushalten können und hält sie auch aus. Schrumpft es dennoch in dem heifsen Paraffin zusammen, so war es eben nicht gut vorbereitet, hatte namentlich nicht lange genug in absolutem Alkohol und nachträglich in Chloroform gelegen.

Will sich der Anfänger in selbständigen mikroskopischen Arbeiten vor Mifserfolgen und Irrtümern schützen, so wähle er nicht ein Paraffin von niedrigem, sondern ein solches von hohem Schmelzpunkte.

Ein grofser Vorteil der Paraffinmethode ist darin zu sehen, dafs trocken geschnitten wird, dafs die Arbeit also eine durchaus saubere ist. In welcher Weise man Paraffin schneidet, soll im nächsten Kapitel erörtert werden.

5) **Celloidineinbettung.** Dieselbe, von Schiefferdecker zuerst empfohlen, erfreut sich einer ausgedehnten Anwendung und hat im Verein mit der Paraffineinschmelzung alle früher üblichen Einbettungsmethoden verdrängt. Man verfährt bei derselben folgendermafsen. Da das käufliche Celloidin meistens nicht völlig lufttrocken, infolgedessen undurchsichtig und von weifslicher Farbe ist, so zerschneidet man dasselbe in ganz kleine Stückchen und läfst dieselben, vor Staub geschützt, so lange liegen, bis sie lufttrocken sind. Die vollständige Lufttrocknung erkennt man daran, dafs die Celloidinstückchen ganz hart sind, ein bräunliches Aussehen haben und durchsichtig erscheinen. Nun bringt man in ein mit einem guten Kork versehenes Glasgefäfs

(eingeschliffene Glasstöpsel sind unter allen Umständen zu vermeiden, da sie erstens nie genau genug schliefsen und da sie zweitens durch das gelöste Celloidin so fest an den Flaschenhals angeheftet werden, dafs man sie nicht mehr entfernen kann) eine Mischung aus Alkohol absolutus und Äthyläther zu gleichen Teilen und gibt so viel Celloidin hinzu, dafs daraus eine Lösung von Honigkonsistenz wird. Dazu sind oft Wochen erforderlich; die Auflösung des Celloidins mufs man dadurch zu befördern suchen, dafs man sehr oft gründlich Celloidin und die Alkoholäthermischung in dem Glasgefäfse schüttelt. Die Lösung mufs klar und durchsichtig sein; ist das nicht der Fall, so war entweder das Celloidin nicht lufttrocken oder der Alkohol nicht absolut. In solchem Falle schüttet man am besten die Lösung in eine offene Schale und wartet, bis Alkohol und Äther verdunstet sind und das Celloidin *völlig* lufttrocken geworden ist; denn trübe Lösungen sind von Nachteil, weil sie die Orientierung des Präparates erschweren.

Die oben erwähnte Celloidinlösung von Honigkonsistenz benutzt man als *Stammflüssigkeit*, aus der man sich durch *Verdünnung*, die wiederum mittels eines Gemisches von Alkohol absolutus und Äther zu gleichen Teilen hergestellt wird, zwei weitere Lösungen anfertigt, von denen die eine etwa Glycerinkonsistenz hat, die andere noch dünner ist. Doch kann man auch ganz gut die dritte Lösung entbehren.

Das Präparat, das in Celloidin eingebettet — *celloidiniert* — werden soll, wird zunächst in absolutem Alkohol gut entwässert und kommt dann, um etwaige letzte Spuren von Wasser noch auszutreiben, auf 24—48 Stunden in reinen Äthyläther oder in eine Mischung von gleichen Raumteilen Alkohol absolutus und Äther. Zartere Objekte pflege ich stets nur in das Alkoholäthergemisch, kompaktere dagegen, z. B. Gehirne, stets in reinen Äther zu bringen. Aus dem Äther bez. Alkoholäther wird das Präparat für etwa 8 Tage zunächst in die ganz dünne, dann für weitere 8 Tage in die Celloidinmischung von Glycerinkonsistenz — oder auch sofort in diese — übertragen und kommt dann schliefslich für etwa 4—5 Tage in die dickflüssige Lösung (Stammflüssigkeit).

Nachdem so das Präparat gut mit dem Celloidin durchtränkt ist, mufs man es noch *erhärten*. Das kann entweder so geschehen, dafs man das dem dicken Celloidin entnommene Präparat direkt in 80 % oder dünneren Alkohol einbringt, wobei man es, um ein Schwimmen zu verhüten, in geeigneter Weise zum Untersinken bringen mufs. Oder aber — und *das ist für alle Fälle vorzuziehen* — man verfährt auf folgende Weise: Man gieft in eine Glasschale von dem dicken Celloidin so viel hinein, dafs das in die Schale eingebrachte bereits celloidinierte Präparat völlig bedeckt ist. Das Einbringen sowie das Orientieren des Präparates hat möglichst schnell zu geschehen, damit sich nicht auf der Oberfläche des ausgegossenen Celloidins durch Verdunstung eine Haut bildet. In der Glasschale, welche je nach der Temperatur ganz offen bleibt oder halb bedeckt wird — bei grofser Wärme bedeckt, bei Kälte offen —, bleiben die Objekte 1—2 Tage. Diese Zeit genügt, um das Celloidin durch Verdunstung des Alkohols und Äthers so fest zu machen, das ein nunmehriges Einbringen in Alkohol keine oder nur sehr wenige Luftblasen in dem Celloidin entstehen läfst. Statt der Glasschale kann man sich auch nach Apáthy eines bei der Paraffineinschmelzung üblichen Papierkästchens bedienen. Der gewöhnlichen

Vorschrift nach legt man die ganze Glasschale oder das Papierkästchen in 70 %—80 % Alkohol, wobei das Papierkästchen mit einer Glasplatte, damit es untersinkt, zu beschweren ist. Ich habe gefunden, dafs das Celloidin schneller erhärtet, wenn man dasselbe in 50 % Alkohol bringt. In dem Alkohol bleiben Glasschale bez. Papierkästchen so lange, bis das Celloidin hart geworden ist; das dauert gewöhnliche einige Tage. Genügend erhärtetes Celloidin mufs sich leicht und glatt schneiden; man prüft daher den Grad der Erhärtung, indem man am Rande der Glasschale oder des Papierkästchens mit einem spitzen Skalpell einsticht; geht die Spitze glatt durch, so ist die Härtung beendet, trifft sie noch auf Celloidinbrei, so mufs in den Alkohol zurückgebracht werden.

Nach der Erhärtung wird das Präparat aus der Glasschale bez. dem Kästchen herausgenommen und von dem umgebenden Celloidin so viel fortgeschnitten, dafs um das Präparat nur eine schmale Schicht der Einbettungsmasse stehen bleibt. Ein solcher Celloidinblock mufs, damit man ihn mit dem Mikrotom schneiden kann, *aufgeklebt* werden. Man klebt entweder auf *Holz* oder *Metall* oder *Stabilit* auf, während Kork und Hollundermark zu verwerfen sind. Die *Metallklötze* werden bei einigen Mikrotomen (z. B. dem Jung'schen) mitgeliefert; an *Holzklötzen* hält man sich so viel vorrätig, als man braucht; dieselben müssen der Präparatenklammer des Mikrotoms angepafst sein. Das *Stabilit*, in jüngster Zeit von Jelinek zum Aufkleben empfohlen, ist ein von der allgemeinen Elektrizitätsgesellschaft in Berlin empfohlenes Isolationsmaterial von roter oder grauer Farbe und homogener Beschaffenheit. Man nimmt Platten von 8—10 mm. Stärke, aus denen man sich Klötzchen von der gewünschten Gröfse (1 cm. Seitenlänge und mehr) aussägt.

Welchen der drei Stoffe — Holz, Metall, Stabilit — man auch zu Klötzchen verwenden will: *das Verfahren des Aufklebens* ist stets das gleiche. Man bringt auf diejenige freie Fläche des Klötzchens, auf die man aufkleben will, ein wenig von dem dicken Celloidin, taucht die Unterseite, also die von der zu schneidenden Fläche abgewendete, des das Präparat enthaltenden Celloidinblocks auf einige Sekunden in reinen Äther, um sie zu erweichen, trocknet rasch ab, drückt sie auf die befeuchtete Seite des Klötzchens fest an und bringt nach einigen Minuten, wenn das Celloidin des Klötzchens durch Verdunsten eine Haut bekommen hat, in 70 %—80 % Alkohol oder, *nach meinem Vorschlage*, in 50 % Alkohol. Nach 3—4 Stunden, spätestens nach 24 Stunden, sind im 50 % Alkohol die Paraffinblöcke auf den Klötzchen fest, in dem stärkeren Alkohol sind mehrere Tage zum Festwerden erforderlich. Metall und Stabilit sinken in Alkohol unter; man stellt derartige Klötze daher in dem ein reichliches Quantum Alkohol enthaltenden Gefäfse so auf, dafs das Präparat nach oben sieht. Holz dagegen schwimmt; damit es untersinkt, das Präparat also eintaucht, hat man empfohlen, das Klötzchen mit Nägeln zu beschweren. *Ich möchte folgendes Verfahren vorschlagen*, das sich mir stets bewährt hat. Man füllt ein cylindrisches Glasgefäfs bis an den Rand mit dem zum Erhärten gewählten Alkohol. Dann nimmt man das Holzklötzchen mit dem Präparate und taucht es, nachdem sich die Celloidinhaut gebildet hat, *verkehrt, also das Präparat nach unten*, in das Alkoholgefäfs. Jetzt schiebt man eine Glasplatte so über den Rand des cylindrischen Gefäfses hinweg, dafs die freie Fläche des Klötzchens die Platte be-

rührt. Das Klötzchen hängt dann senkrecht in dem Alkohol und das Präparat ist von allen Seiten von der erhärtenden Flüssigkeit umgeben. Ich habe *niemals* ein Abreifsen des Präparates vom Klötzchen zu beklagen gehabt. Um die celloidinierten Präparate voneinander unterscheiden zu können, *bezeichnet* man entweder die Klötzchen oder die Celloidinblöcke mit etwas Ölfarbe.

Celloidinpräparate *schneidet* man unter Alkohol. Will man *dünne* Schnitte anfertigen, so befeuchtet man Messer und Schnittfläche des Präparates mit 50 % Alkohol; will man *dickere* Schnitte herstellen, so mufs man die Oberfläche des Celloidinblocks erweichen, was man dadurch erreicht, dafs man unter 90 %—95 % Alkohol schneidet.

Celloidin hat den Nachteil, dafs es sich *sehr* intensiv mit allen Farbstoffen mitfärbt; man thut daher gut, sogenanntes *durchgefärbtes* Material zu nehmen. Nur bei der später noch zu erwähnenden Weigert'schen Hämatoxylinmethode wird es in der Differenzierungsflüssigkeit fast völlig entfärbt. Da das Paraffin vor der Färbung der Schnitte aufgelöst wird, so steht hierin das Celloidin dem Paraffin nach. Sonst ist die Celloidinmethode der Paraffinmethode durchaus ebenbürtig und übertrifft sie darin, dafs es mit derselben möglich ist, so voluminöse Organe wie Säugetiergehirne ganz zu durchtränken, was beim Paraffin nicht ohne Schädigung des Materiales erreicht werden kann. Zum Studium des Baues des Zentralnervensystems ist die Celloidinmethode daher fast unentbehrlich.

6) **Photoxylin.** Diese Substanz wird in genau der gleichen Weise verwendet wie das Celloidin und übertrifft das letztere dadurch, dafs sie viel leichter löslich ist — eine honigdicke Lösung ist binnen 24 Stunden aus dem lufttrockenen Präparat herzustellen — und nach der Härtung klar durchsichtig bleibt, während Celloidin im Alkohol weifs wird. Ich ziehe daher Photoxylin vor.

Von verschiedenen Seiten hat man empfohlen, celloidinierte Objekte nachträglich mit Paraffin zu durchtränken, um sie trocken schneiden zu können. Ich sehe den Zweck dieser nicht gerade sinnreichen Methode nicht ein, denn durch dieselbe werden weder die wirklichen Vorteile der Paraffin- noch die der Celloidintechnik erhalten. Was man beim Celloidin will — Vermeiden der hohen Temperaturen, Möglichkeit der Anfertigung gleichmäfsiger dickerer Schnitte — wird durch das Paraffin nachträglich paralysiert. Aufserdem hat man nunmehr zwei Einbettungsmassen, was doch auch nicht gerade als ein Vorteil zu betrachten ist. Ich habe daher von der Schilderung dieser Methoden Abstand genommen, da ich der Meinung bin, dafs sie über den Kreis der Liebhaber von Besonderheiten sich nicht ausbreiten, vielmehr recht bald und verdientermafsen vergessen sein dürften.

Die vorstehend gegebenen Regeln kann sich jeder Forscher nach seiner individuellen Geschicklichkeit modifizieren, jeder wendet bei längerem Arbeiten gewisse durch die Erfahrung gegebenen Kunstgriffe an. Dieselben zu lehren ist selten möglich, da die einzige Lehrmeisterin die eigne Erfahrung ist; ich habe daher hier nur die prinzipiell wichtigen Vorschriften gegeben.

Kap. VI. Schneiden und Aufkleben.

a) Schneiden.

1) **Das Schleifen des Messers.** Um einen guten, brauchbaren Schnitt herzustellen, ist es durchaus notwendig, dafs das Messer scharf ist, gleichgiltig ob man aus freier Hand schneidet oder sich eines Instrumentes, des Mikrotoms, bedient. Zum Freihandschneiden kann man ein gewöhnliches Rasiermesser nehmen, zum Schneiden mit dem Mikrotom bedarf es in den allermeisten Fällen anderer Messer. Gewöhnlich nämlich sind die Präparate, zu deren Zerlegung in Schnitte man sich eines Mikrotoms bedient, nämlich die in Paraffin oder Celloidin bez. Photoxylin eingebetteten, viel härter als das dem Alkohol oder einer anderen erhärtenden Flüssigkeit entnommene Material. Von paraffinierten Objekten ist dies ohne weiteres klar, bei celloidinierten ist es gleichfalls mit wenigen Ausnahmen der Fall. Die gewöhnlichen Rasiermesser nun haben eine *federnde Schneide*, sind bikonkav und sehr dünn geschliffen. Würde man diese bei hartem Materiale benutzen, so würden sie keine guten, dünnen Schnitte geben können, weil sie sich infolge der Biegsamkeit der Schneide werfen. Man mache einmal den Versuch, mit einem solchen Messer von einem Paraffinblock einen Schnitt von 10 μ Dicke anzufertigen, man wird die Unmöglichkeit sofort erkennen und sehen, wie die Messerschneide, sowie sie in das Paraffin kommt, sich biegt und dem Block ausweicht. Die Messer, die zu Paraffin und Celloidin (Photoxylin) verwandt werden sollen, müssen daher fester und schwerer sein und dürfen keine federnde Schneide besitzen. Diese Messer sind plankonkav geschliffen, die ebene Fläche ist es, welche über das Präparat hinweggezogen wird. Solche plankonkaven Messer kann man übrigens auch, wenn sie in einem geeigneten Stiele stecken, zum Freihandschneiden benutzen.

Gewöhnliche Rasiermesser können von den chirurgischen Instrumentenmachern ganz gut geschliffen werden, Mikrotommesser dagegen werden von ihnen meistens ruiniert; wenigstens habe ich früher, ehe ich meine Messer selber schliff, dieselben von den Instrumentenmachern stets mit federnder Schneide, also unbrauchbar, zurückerhalten. Ist das Messer schartig, so ist dasselbe an den Fabrikanten, von dem das Mikrotom stammt, zurückzusenden, denn um Scharten auszuschleifen, bedarf es eines drehbaren Steines, der wohl selten in den Laboratorien vorhanden ist. Ist das Messer dagegen blofs stumpf, so ist es am besten, es selber zu schleifen; gelingt diese Manipulation im Anfange auch nicht sofort, so erspart man doch wenigstens den Ärger, den einem ein ruiniert vom Instrumentenmacher zurückgeschicktes Instrument bereitet. Übrigens gehört zur Erlernung der Kunst des Schleifens nichts weiter als Geduld und Aufmerksamkeit, mit denen man schliefslich doch zum Ziele kommt.

Zum *Scharfmachen bei ganz stumpfem Messer* benutzt man einen Schleifstein. Der bei den sogenannten „chinesischen“ Streichriemen von Zimmer in Berlin vorhandene braune Stein ist, wenn möglich, nicht zu gebrauchen, weil er für Mikrotommesser zu rauh und daher meines Erachtens gefährlich ist. Als Schleifstein dient ein sogenannter fran-

zösischer oder Ölstein oder ein Mississippistein. Zur Befeuchtung des Steines empfiehlt Fol ein Gemisch aus 2 Teilen Glycerin und 1 Teil Alkohol. Besser ist es, *amerikanisches Knochenöl*, welches in der Kälte nicht flockig wird, oder *gewöhnliches Knochenöl* zu benutzen. Man gieſst auf den Stein so viel Öl auf, daſs das Messer leicht gleitet und daſs seine Schneide stets unter Öl ist. Man führt nun das Messer so auf dem Steine, daſs man es flach auflegt und es *mit der Schneide voran*, *ohne irgendwie zu drücken*, schräg vorschiebt. Das Messer muſs durch seine eigne Schwere auf dem Steine bleiben. Bei dem Vorschieben hat man *sorgfältigst* darauf zu achten, daſs kein Teil des Rückens oder der Schneide sich von der Fläche des Steines abhebt, sonst bekommt man ein ungleich geschliffenes Messer. Dann *dreht man auf dem Rücken um* und schiebt, *ebenfalls mit der Schneide voran*, langsam in entgegengesetzter schräger Richtung zurück. Man gewöhne sich von Anfang an daran, die Bewegung des Umdrehens *im Handgelenke* auszuführen, sie wird dadurch leichter und man schont das Messer mehr. Auch muſs man es vermeiden, bei dem Umdrehen das Messer auf den Stein hart aufschlagen zu lassen, weil dabei die Schneide leiden kann. *Vor allen Dingen* aber gewöhne man sich von vornherein daran, das Messer *auf dem Rücken* und nicht über die Schneide *umzudrehen*. Ganz abgesehen davon, daſs das letztere sehr ungeschickt aussieht, kann man dabei auch leicht die Schneide verletzen. Nachdem man etwa 30 bis 50 mal oder noch öfter (je nach der Stumpfheit) das Messer über den Stein geführt hat, trocknet man beide mit einem Leinwandlappen von dem überschüssigen Öl ab; den Stein kann man auch mit etwas Benzin waschen.

Jetzt muſs das Messer noch auf dem *Streichriemen* abgezogen werden, *was übrigens vor jedem Gebrauche zu geschehen hat*. Man benutzt entweder den vortrefflichen groſsen Streichriemen von Walb oder den Zimmer'schen Streichriemen; die stark federnden Riemen der Barbiere sind durchaus zu vermeiden. Das Messer legt man, ganz wie auf den Stein, gleichmäſsig mit Rücken und Schneide auf und führt dasselbe, *jetzt aber den Rücken voran*, *ohne jeden Druck* schräg nach vorn, *dreht auf dem Rücken um* und zieht, *wiederum den Rücken voran*, in entgegengesetzter Richtung zurück. Benutzt man den Walb'schen Streichriemen, so genügt ein 10—20 maliges Abziehen, bei dem Zimmer'schen streicht man etwa 6—8 mal auf dem roten, 10—15 mal auf dem schwarzen und doppelt so oft auf dem weiſsen Leder. Der Druck beim Abziehen des Messers auf dem Stein und dem Streichriemen muſs darum vermieden werden, weil durch denselben die Schneide *abgestumpft und nicht geschärft* wird.

Nach dem Abziehen auf dem Streichriemen wird das Messer, falls solches notwendig, mit einem Lederlappen abgewischt; die genügende Schärfe prüft man dadurch, daſs man ein Kopfhaar zwischen Daumen und Zeigefinger hält und das Messer dicht über dem Finger durch das Haar zieht. Wird letzteres durchschnitten, so ist das Messer scharf genug, wird es aber nicht durchschnitten, so muſs auf dem Riemen und, wenn nötig, auf dem Steine noch einmal abgezogen werden.

Ich will noch darauf aufmerksam machen, daſs *zu langes Abziehen* auf dem Streichriemen den entgegengesetzten Erfolg als den beabsichtigten haben kann, das Messer wird nämlich stumpf. Es gehört einige Übung dazu, um bei allen diesen Manipulationen das richtige Maſs zu halten, und es ist wichtig, bei miſslungenen Versuchen sich

über die Ursache des Mifslingens Aufklärung zu verschaffen; man kann dadurch das meiste für's Schleifen lernen.

2) **Die Stellung des Messers.** Beim Schneiden mit denjenigen Mikrotomen, bei welchen das Messer fest in eine Klammer eingespannt und durch Schlittenführung *bewegt* wird, ist die Stellung, welche man dem Messer gibt, von Wichtigkeit für das Gelingen der Schnitte.

Beim Schneiden von Paraffin kann die Stellung eine doppelte sein; entweder nämlich wird das Messer *quer zur Achse des Instrumentes,* oder *im Winkel zu derselben* befestigt.

Die *quere Messerstellung* ist sehr beliebt, bei den noch zu erwähnenden automatischen Mikrotomen sogar die einzig mögliche. Sie gestattet eine rasche Zerlegung des paraffinierten Materiales in lückenlose Schnittserien, erleichtert die Aufklebung der Schnitte und kürzt so die ermüdende Prozedur des Schneidens beträchtlich ab. Das sind unleugbare *Vorteile,* die wohl in erster Linie die ausgedehnte Anwendung dieser Messerstellung begünstigten. Meines Erachtens hat aber die Methode auch beträchtliche *Nachteile,* die, wie mir scheinen will, nicht genügend beachtet werden, die aber doch hinreichen dürften, die Anwendung der Methode etwas einzuschränken. Dadurch dafs das Messer quer zur Achse des Mikrotoms eingestellt und damit quer durch das paraffinierte Material geführt wird, wird nämlich nicht mehr geschnitten, sondern *gequetscht.* Nur dann kann man von einem Schneiden reden, wenn die Messerklinge *in gleichmäfsigem Zuge* das Material zerteilt, wenn man also nicht blofs eine Stelle der Schneide benutzt, sondern wenn letztere in gröfserer Ausdehnung durch das Objekt geführt wird. Die quere Durchtrennung des Materiales hat bei sehr dünnen Schnitten nach meinen Erfahrungen den Nachteil, dafs die Schnitte sich fälteln und häufig verzerrt werden, sodafs die einzelnen Teile des Objektes, wenn auch nur wenig, gegeneinander verschoben werden können. Nur bei ganz kleinen Objekten halte ich daher die quere Messerstellung für erlaubt, bei irgendwie voluminöseren und diffizileren würde ich von derselben abraten.

Das Messer mufs bei dieser Stellung genau einen rechten Winkel mit der Längsaxe des Instrumentes bilden, sonst gelingen die Schnitte nicht. Der Paraffinblock mufs ferner hierbei in besonderer Weise zugeschnitten werden; er mufs ein Rechteck bilden und es müssen die dem Messer zugekehrte und die abgekehrte Fläche genau einander gleich sein. Darauf bringt man mit einem erwärmten Metallspatel oder mit einer erwärmten Messerklinge auf die dem Messer gegenüberstehenden, von diesem also parallel getroffenen Flächen des Blocks etwas flüssig gemachtes sogenanntes fadenziehendes Paraffin, dessen Schmelzpunkt bei circa 40 ° C. liegt. Wieviel von diesem Paraffin auf beide Flächen des Materiales aufzutragen ist, läfst sich nicht genau angeben, vor zu viel möchte ich warnen, da dies Paraffin sehr fett ist und dadurch leicht die Schnitte an der Messerklinge kleben bleiben. Nachdem diese Paraffinschicht fest geworden, schmilzt man auf einen Holzklotz oder mit Paraffin ausgegossenen Metallzylinder auf (das Aufschmelzen kann auch vor dem Überziehen mit dem weichen Paraffin vorgenommen werden) und drückt das Messer durch das Objekt hindurch. Meistens bleibt der erste Schnitt glatt auf dem Messer liegen, ohne dafs ein besonderer Schnittstrecker anzuwenden wäre. Jeder folgende Schnitt klebt infolge des weichen Paraffins an dem vorhergehenden fest, so

dafs man ein langes Band aneinander gereihter Schnitte erhält. Weil ein solches Band der Proglottidenkette einer Tänie gleicht, hat man die Methode auch „Bandwurmmethode“ genannt.

Bei *schräger Messerstellung* mufs man sich den Paraffinblock in anderer Weise herrichten. Man schneidet zunächst das über das Objekt stehende Paraffin soweit weg, dafs nur noch ein Rand von 3—5 mm. Dicke zurückbleibt; nur auf der Seite, welche auf den Holzklotz oder auf den Metallzylinder aufgeschmolzen werden soll, bleibt mehr erhalten, damit, wenn die letzten Partieen des Objektes zu schneiden sind, das Messer nicht auf das Holz oder das Metall aufstöfst. Den aufgeschmolzenen Block schneidet man sich nun so zurecht, dafs die Oberfläche, wenn möglich, die Gestalt eines Dreiecks hat, und man richtet das Präparat so zum Messer, dafs letzteres beim Durchziehen eine der Seiten voll trifft. *Die Hauptsache* ist bei schräger Messerstellung, dafs das Messer zuletzt auf einen *spitzen Winkel* des Paraffinblocks und nicht auf eine Seite trifft; in letzterem Falle nämlich läfst sich der Schnitt schwer und häufig nicht unverletzt vom Messer abheben, im ersteren Falle dagegen gelingt das sehr leicht, da die Berührung von Schnitt und Schneide nur an einem Punkte statt hat.

Der Winkel, den bei schräger Stellung das Messer mit der Axe des Instrumentes bilden soll, ist am besten einer von 45°; spitzere Winkel, also eine Messerstellung, die sich der Axe des Instrumentes mehr nähert, sind nicht vorteilhaft, weil das Schneiden dadurch erschwert wird und die Schnitte sich häufig so zusammenrollen, dafs sie nicht mehr glatt zu machen sind.

Das Zusammenrollen der Schnitte ist überhaupt ein Übelstand, der sich beim Schneiden mit schräger Messerstellung einstellt. Um dies zu vermeiden, hat man sogenannte *Schnittstrecker* konstruiert, deren einfachster wohl der von P. Mayer in Neapel angegebene und von Jung in Heidelberg gelieferte ist. Die Nadel dieses kleinen Instrumentes wird so auf dem Messer gelagert, dafs sie halb über die Schneide übersteht; doch mufs man sich bei jedem Objekte die beste Nadelstellung jedesmal ausprobieren. Die Schnitte rollen sich häufig um die Nadel des Schnittstreckers, können aber von hier mit Leichtigkeit mittels einer *Pinzette mit glatten Branchen* abgehoben werden.

Besitzt man keinen Schnittstrecker, so kann man sich in folgender Weise behelfen, wie ich es früher that: An einem 1—2 cm. breiten Streifen von *Pergamentpapier*, dessen Länge beliebig gewählt werden kann, rundet man die Ecken der beiden schmalen Seiten sorgfältig ab. Kommt das Messer in das Paraffin, so hält man den Papierstreifen dicht über das Präparat und zieht das Messer durch. Man darf dabei die das Papier haltende Hand nicht bewegen, weil sonst der Schnitt beschädigt wird; auch mufs man sich hüten, mit der Hand das Messer zu drücken, weil man dadurch die Neigung des letzteren zum Präparate ändert und infolgedessen die Schnitte ungleich dick werden. Beobachtet man diese Kautelen, so bleibt der Schnitt unter dem Papierstreifen glatt und kann nun mit einer feinen glatten Pinzette fortgenommen werden.

Was das Tempo anlangt, in welchem das Messer durch das Paraffin gezogen werden soll, so bin ich in der Ansicht, dafs dies bei schräg gestelltem Messer stets langsam zu geschehen hat, um so langsamer, je dünner der Schnitt werden soll. Nur bei quergestelltem Messer ist ein schnelles Durchziehen zulässig. *Vor allem ist das Messer gleich-*

mäfsig durchzuführen und die hierzu nötige Geschicklichkeit erwirbt man sich, auch bei den Instrumenten, bei welchen der Messerschlitten durch eine Kurbel bewegt wird, erst durch lange Übung.

Sehr häufig hat man mit dem Übelstande bei Paraffinmaterial zu kämpfen, dafs die Schnitte ungemein leicht brechen, entweder weil das Objekt übermässig stark gehärtet worden ist, dann aber auch weil dasselbe an und für sich sehr brüchig ist. Letzteres ist namentlich der Fall bei den dotterreichen Eiern der Synascidien und der Insekten, bei dem Chitinpanzer der Arthropoden etc. Die folgenden beiden Vorschriften sind gegeben, um das Brechen und Reifsen der Schnitte zu verhüten, und können bei jedem Materiale, das diesen Übelstand besitzt, angewendet werden.

Nach der einen Vorschrift, die von v. Davidoff herrührt, bestreicht man die Fläche des Paraffinblocks, *jedesmal bevor man einen Schnitt macht*, mit *Kollodium* und schneidet nach dem Erstarren. Die andere, ähnlich lautende Vorschrift stammt von Heider. Man macht sich eine Mischung von käuflichem *Kollodium* und einer syrupdicken Lösung von *Mastix* zu gleichen Teilen und verdünnt sie mit einem Gemisch von Äther und Alkohol zu gleichen Teilen so, dafs sie wasserdünn wird. *Diese Mastixkollodiumlösung* streicht man jedesmal vor dem Schneiden mit einem feinen Haarpinsel über die Schnittfläche und schneidet nach dem Erstarren. Das Mastixkollodium kann man auch verwenden, wenn man *sehr* dünne Schnitte (3 μ und darunter) anfertigen will. Durch die die Schnittfläche überziehende Haut wird das zu Schneidende etwas dicker und zerreifst nicht wegen der Zähigkeit des Überzuges. Man mufs beim Aufkleben nur sorgfältig darauf achten, dafs man nicht die Hautseite auf Deckglas bezw. Objektträger auflegt. Die Haut löst sich in dem später anzuwendenden Alkohol, ist übrigens bei durchgefärbtem Materiale belanglos.

Ist man nicht im stande, das aufgeklebte Objekt an einem Tage fertig zu schneiden, mufs man vielmehr die Arbeit bis zum nächsten Tage verschieben, so hüte man sich, das Messer aus der Klammer zu entfernen. Es gelingt sehr selten, am nächsten Tage dasselbe wieder so einzustellen, dafs genau die nämliche Stelle, mit welcher man zuerst geschnitten hat, zur Verwendung kommt. Damit ist aber der Nachteil verbunden, dafs die Neigung des Messers zum Präparate eine andere wird und die Richtung, in der letzteres durchschnitten wird, nicht die gleiche ist wie anfangs.

Paraffinmaterial, welches angeschnitten über Nacht in der Mikrotomklammer gestanden, zeigt die Eigentümlichkeit, dafs das Messer, wenn man von der beibehaltenen Stellung aus schneiden will, nicht fafst, sondern über die Schnittfläche weggleitet. Man hat es hier offenbar mit einer Austrocknung zu thun, auf die man acht geben mufs, wenn man nicht Material verlieren will.

Beim Schneiden von celloidiniertem Materiale ist eine quere Messerstellung gänzlich ausgeschlossen, hier mufs das Messer in schräger Richtung eingeklemmt werden und es sollte der Winkel, welchen dasselbe mit der Axe des Instrumentes bildet, nie 30° übersteigen. Das Messer mufs bei grofsen Objekten langsam, kann bei kleinen schnell durch das Material geführt werden, doch ist in letzterem Falle ein Zerreifsen einzelner Schnitte zu befürchten. Bei Celloidinpräparaten ist das Messer stets gut befeuchtet zu erhalten, damit der Schnitt auf der Klinge schwimmt und nicht an ihr kleben bleibt; es ist daher,

wenn nötig, mit einer Pipette oder einem Haarpinsel Alkohol auf das Messer während des Durchschneidens des Materiales nachzuträufeln.

Beim Schneiden von Material, das blofs *umrandet* ist, mufs das Messer ebenfalls in einen Winkel von 20—30 ° schräg gestellt sein.

Wir unterscheiden zweierlei Arten des Schneidens, das Schneiden mit freier Hand und das Schneiden mit einem Instrumente, dem Mikrotom. Das Freihandschneiden kann bei hinreichender Geschicklichkeit ganz brauchbare Schnitte liefern, wie solche für histiologische Übungskurse oder zur vorläufigen Orientierung ausreichen; es sollte daher stets geübt werden. Für feinere, namentlich embryologische Untersuchungen aber reicht es nicht aus. Die menschliche Hand besitzt selten soviel Geschicklichkeit, um Hunderte von Schnitten hintereinander von gleichmäfsiger Dicke anfertigen zu können; hier mufs helfend das Instrument eintreten. Wir übertragen das Halten des Präparates, das Vorwärtsschieben desselben und die Haltung und event. Bewegung des Messers meistens maschinellen Teilen und gewinnen so eine sehr gleichmäfsige, sichere und genau zu kontrolierende Zerlegung des Materiales. Das Instrument, welches die Hand des mikroskopisch forschenden Menschen ersetzt, ist das *Mikrotom;* dasselbe wurde von Welcker erfunden, von His verbessert und in ausgedehnter Weise zu embryologischen Untersuchungen verwendet und hat sich dann schnell einen dauernden Platz in jedem Laboratorium erworben. Gegenwärtig sind verschiedene Modelle vortrefflicher Konstruktion im Gebrauch, welche darthun, einen wie grofsen Fortschritt die technische Vervollkommnung des Instrumentes und damit pari passu die wissenschaftliche Forschung gemacht haben.

Ich will zunächst die Methode des Freihandschneidens und dann die gebräuchlichsten Mikrotome kurz beschreiben.

3) **Freihandschneiden.** Man fafst das in Leber oder Hollundermark oder auch gar nicht eingeklemmte, gut gehärtete Material zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand, legt das mit der rechten Hand gehaltene, gut mit starkem Alkohol oder mit Wasser befeuchtete Rasiermesser an den Rand des Präparates, parallel zu dessen Oberfläche, sodafs die Schneide dem Schneidenden zugekehrt ist und zieht gleichmäfsig, nicht zu schnell und nicht zu langsam, das Messer durch das Präparat. Damit die Schnitte dünn werden, empfiehlt es sich, zunächst ein klein wenig das Präparat einzuschneiden und dann möglichst flach das Messer durchzuziehen. Ist ein Schnitt gemacht, so wird derselbe mit Wasser oder Alkohol von der Klinge abgespült. Gewöhnlich zeigt es sich, dafs nur die Stellen des Schnittes, an denen das Messer zuletzt hingekommen, einigermafsen dünn sind. Es gehört viel Übung, viel Geduld und einige Geschicklichkeit dazu, um brauchbare Präparate herzustellen.

4) **Die Mikrotome.** Es sind hauptsächlich die 4 Modelle im Gebrauch, die nachstehend beschrieben werden.

α) **Cylinder- oder Schraubenmikrotom.** (Schiefferdecker'sches Mikrotom, Gudden'sches Mikrotom). Es soll nur das letztere beschrieben werden, das Schiefferdecker'sche Modell, das für kleines Material geeignet ist, ist kaum noch in Gebrauch. Das Gudden'sche Mikrotom besteht aus einem festen Metallcylinder, in welchem sich ein Stempel

befindet, dessen höhere oder tiefere Stellung mittels einer Mikrotometerschraube reguliert wird. Der Cylinder ist am Boden einer grofsen Wanne eingelassen. Geeignet ist das Instrument wohl nur für Gehirn und Rückenmark, welche unter Wasser, mit dem die Wanne des Instrumentes angefüllt wird, geschnitten werden und zu deren Befestigung die im vorigen Kapitel erwähnte Masse dient. Als praktisch wichtig beim Gebrauche dieses Instrumentes sind folgende Regeln zu beachten, die Forel, ein Schüler Gudden's, genauer angegeben und deren Vernachlässigung ein Mifslingen der Präparate zur Folge hat. Die Einbettungsmasse *dient nur als Stütze des Präparates im Cylinder,* nicht aber als Stütze der einzelnen Schnitte. Man mufs sie daher beim Beginn des Schneidens um das Präparat so weit abtragen, als es ohne Gefährdung des sicheren Haltes desselben möglich ist. An der zu schneidenden Stelle selber darf keine Masse haften, denn dieselbe würde das Messer verunreinigen, es fettig machen, würde die Sicherheit der Messerführung beeinträchtigen und infolgedessen die Anfertigung einer lückenlosen Schnittserie hindern. Will man das Schneiden unterbrechen, so läfst man das Wasser aus der Wanne ablaufen und übergiefst das sorgfältig abgetrocknete Präparat mit heifs gemachter Gudden'scher Masse. Die Schnitte schwimmen im Wasser, aus dem sie vorsichtig mittels einer befeuchteten Glasplatte oder mit einem breiten Hornspatel herausgenommen werden.

Das Messer wird hier mit der Hand geführt; man fafst dasselbe an den beiden Griffen, legt es flach auf die Glasplatte, welche über den Rand des Cylinders übersteht, und zieht es in stätigem Zuge langsam durch das Präparat. Jedes Drücken ist zu vermeiden, sonst wird der Schnitt gequetscht, und man mufs *in einem* Zuge *gleichmäfsig* schneiden, sonst bekommt der Schnitt sogenannte Treppen.

β) **Schrauben-Schienenmikrotom** (Schanze'sches *Mikrotom,* auch von Becker in Göttingen hergestellt). An dem einen Ende des Instrumentes befindet sich eine um zwei Achsen drehbare Vorrichtung, welche die Klammer für die Präparate trägt. In dieser Klammer wird der Holzklotz oder worauf man sonst aufgeschmolzen bez. aufgeklebt hat, befestigt und zunächst *das Präparat orientiert.* D. h. man dreht es in eine der beiden Achsen der Vorrichtung, dafs, wenn das Messer nachher durchgezogen wird, dieses in der gewünschten Richtung das Präparat trifft. Eine solche Orientierung ist in den weitaus meisten Fällen vorzunehmen, denn es ist von Wichtigkeit zu wissen, ob man quer oder schräg zur Längs- bez. Querachse des Objektes schneidet. Unter der Orientiervorrichtung ist eine mit einer grofsen graduierten Scheibe versehene Mikrometerschraube, durch deren Umdrehung, welche man beliebig grofs machen kann, jene das Präparat tragende Vorrichtung senkrecht in die Höhe gehoben wird. An einer breiten, die ganze Länge des Instrumentes einnehmenden Metallplatte, welche an einer Stelle einen Einschnitt für die Scheibe besitzt, ist diese ganze Einrichtung befestigt. Auf der von derselben abgewandten Seite der Platte, etwa in halber Höhe derselben, ist eine in einem nach oben offenen, spitzen Winkel gestellte Schiene angebracht, ebenfalls in der ganzen Länge des Instrumentes. Auf der Schiene, sich anlehnend an die Platte, befindet sich der Schlitten, welcher das Messer trägt. Indem dieser langsam die Schiene entlang gezogen wird, was mit der Hand oder, wie an manchen Instrumenten, mit einer Kurbel geschehen kann,

schneidet man den Teil des Präparates ab, der über das Niveau des Messers übersteht. Damit die Schlittenbewegung eine gleichmäfsige und sanfte ist, mufs die Schiene gut mit Knochenöl eingeölt sein. Ist statt der Metall- eine Glasschiene angebracht, so ist das Ölen nicht notwendig.

Zum Aufschmelzen der Paraffinblöcke bedient man sich am besten kleiner länglicher, in die Klammer passender und auf ihrer oberen Fläche mit einer Paraffinschicht versehener Klötzchen.

γ) **Schienenmikrotom** (Rivet-Leiser'sches Mikrotom, Fritsch'sches M., Thoma-Jung'sches M.; auch von Becker in Göttingen hergestellt). Wie bei dem vorigen Modell wird das Messer auf einem Schlitten in einer Schienenbahn geschoben, abweichend von demselben wird aber auch der Präparatenträger bei dem Thoma-Jung'schen Modell auf einer Schiene mittels Mikrometerschraube vorwärts bewegt. Dieser Präparatenträger sollte stets mit der Neapler Orientiervorrichtung versehen sein. Bedingung für eine gute Funktion des Jung'schen Mikrotoms ist die Sauberkeit der Schlittenbahn des Messerträgers. Man reinigt dieselbe vor dem jedesmaligen Gebrauche durch einen mit Benzin befeuchteten Lappen und ölt sie dann gut ein, so dafs der Schlitten angestofsen mit Leichtigkeit die ganze Bahn durchgleitet. Um ferner die Messerschlittenbahn in gutem Zustande zu erhalten, soll man beim Schneiden den Schlitten stets die ganze Bahn entlang ziehen, damit die Abnutzung derselben überall eine gleiche ist. Bei dem von Becker angefertigten Instrumente gleitet der Schlitten auf Spiegelglas, hier ist also ein Ölen nicht notwendig.

Die Bahn für den Präparatenschlitten mufs sehr sauber gehalten und kann gelegentlich, aber dann nur sehr wenig, geölt werden.

δ) **Automatisches Mikrotom** (Rocking-Mikrotom, Minot-Zimmermann'sches M., Reinhold-Giltay'sches M.). Das Modell dieser Instrumente weicht darin von den anderen Mikrotomen ab, dafs das Messer fest steht und das Präparat nach demselben hin verschoben wird. Durch Kurbeldrehung wird das Präparat vorgerückt, über das Messer geführt und wieder gehoben. Das Messer ist quer gestellt und in einer Klammer festgehalten; es wird nicht durch die Kurbel bewegt. Mit diesen Mikrotomen kann man in sehr kurzer Zeit sehr umfangreiche Serien herstellen.

ε) **Gefriermikrotom.** An den unter *β* und *γ* beschriebenen Modellen läfst sich eine Vorrichtung anbringen, um frisches Material zum Gefrieren zu bringen und das Gefrorene zu schneiden. Das *frische* Organ wird auf eine rauhe Metallplatte gelegt und durch Einwirkung von Ätherdämpfen, die mit einem Spray auf dasselbe gerichtet werden, zum Gefrieren gebracht. Mit *abgekühltem Messer* fertigt man dann möglichst feine Schnitte an, die man auf dem Objektträger auftauen läfst und dann in einer indifferenten Flüssigkeit oder nach geeigneter Färbung in verdünntem Glycerin untersucht. Diese Methode ist indessen ziemlich eingreifend, da die beim Gefrieren entstehenden Eiskrystalle häufig Zerstörungen ausgedehnter Art in den Zellen hervorrufen.

b. Aufkleben.

Die Schnitte sind nun gemacht und müssen, bevor sie weiter behandelt werden und bevor die Präparation definitiv beendet ist, noch einigen Prozeduren unterworfen werden. Die dünnen Paraffinschnitte kann man nicht so ohne weiteres der Einwirkung der lösenden Wirkung von Terpentin oder Xylol aussetzen, sie würden bei den Manipulationen zu leicht zerreifsen, namentlich wenn sie gefärbt und so aus alkoholischen in wässrige Flüssigkeiten, dann wieder in alkoholische und endlich in ölige übergeführt werden müssen. Ganz abgesehen davon, dafs es ein fast aussichtsloses Beginnen wäre, dieselben, wenn sie feucht sind, in Reih und Glied zu erhalten. Celloidinschnitte werden häufig Färbungsmethoden unterworfen, durch welche sie ungemein brüchig werden. Will man also die Mühe des Schneidens sich nicht vergeblich gemacht haben und will man kein Material verschwenden, so *muss man die Schnitte aufkleben.*

Es ist eine sehr beträchtliche Anzahl von Aufklebemethoden empfohlen worden, von denen in den folgenden Zeilen nur ein kleinster Teil angeführt werden soll. Viele Empfehlungen sind nur auf die individuellen Liebhabereien einzelner Forscher zurückzuführen, viele haben sich nicht bewährt; *nur das Bewährte* soll daher hier Aufnahme finden.

5) **Giesbrecht-Mayer'sche Schellackmethode.** Diese war die erste Aufklebemethode überhaupt und hat eine neue Aera in der mikroskopischen Schneidetechnik eröffnet. Sie ist *nur für durchgefärbte Präparate* verwendbar, bei denen also eine Färbung der einzelnen Schnitte nicht mehr nötig ist. Man macht sich eine konzentrierte Lösung von *Schellack,* indem man in absoluten Alkohol soviel weifsen Schellack bringt, als sich lösen will. Durch den das Glasgefäfs mit der Schellacklösung verschliefsenden Kork steckt man einen feinen Glasstab. Vor dem Schneiden richtet man sich die Objektträger her, indem man die sorgfältig gereinigten über einer Spiritusflamme erwärmt, damit die an denselben haftende Feuchtigkeit entfernt wird. Thäte man dies nicht, so würde der Alkohol der Schellacklösung die Feuchtigkeit begierig aufnehmen und die Lösung dadurch sich trüben. Man nimmt jetzt den Glasstab mit dem Kork von der Schellackflasche ab, läfst ihn abtropfen und streicht den ganz glatt angelegten gleichmäfsig und schnell, ehe der Alkohol verdunstet, auf dem erwärmten Objektträger entlang. So breitet man eine dünne Schellackschicht auf demselben aus, die infolge der schnellen Verdunstung des Alkohols bald trocken wird. Ist der Aufstrich mifsglückt, und das wird dem Anfänger bei den ersten Versuchen stets passieren, hat man zuviel Schellack genommen oder nicht gleichmäfsig den Glasstab über den Objektträger hingeführt, oder endlich war der letztere nicht ganz trocken, so entfernt man den Schellacküberzug durch Aufspritzen von absolutem Alkohol. Derartige Objektträger mit Schellacküberzug stellt man sich immer erst vor dem Gebrauche in der voraussichtlich nötigen Zahl her. Diejenigen, deren man nicht gleich benötigt, schützt man durch eine Glasglocke vor dem Einstauben.

Nach der älteren Giesbrecht'schen *Methode* verreibt man nun auf dem Schellacküberzuge in der dem später aufzulegenden Deckglase

entsprechenden Ausdehnung mit dem Finger etwas *Nelkenöl* oder *Kreosot*, sodafs eine leichte Klebrigkeit der Oberfläche entsteht. Jetzt werden die Schnitte auf die Schellackdecke aufgelegt und mit einem feinen Hornspatel, dessen verdünntes eines Ende gegen die Fläche gebogen ist (durch das Institut von G. König sind solche Hornspatel erhältlich), leicht angedrückt, gewissermafsen geplättet. Ist der anzufüllende Raum mit Schnitten bedeckt, so bringt man den Objektträger in den Wärmeschrank oder auf das Neapler Wasserbad. Nach 10 Minuten ist das Öl oder das Kreosot verdunstet und das Paraffin gelöst und die Schnitte können jetzt, ohne sich nur im geringsten zu verschieben, in der Weise eingelegt werden, wie in Kap. IX beschrieben werden soll. Die Löslichkeit des Schellacks in Alkohol erfordert, dafs, sollen die aufgeklebten Schnitte nicht wegschwimmen, Alkohol mit ihnen nicht mehr in Berührung kommen darf.

Paul Mayer *hat diese Methode in der Art modifiziert*, dafs das Bestreichen mit Nelkenöl überflüssig wird. Man legt jetzt die Schnitte ohne weiteres auf die Schellackdecke und drückt sie leicht an. Nach Beendigung der Schnittanordnung bringt man den Objektträger in ein Gefäfs, in das er gerade hineinpafst, auf dessen Boden sich eine ganz kleine Quantität von Äther befindet. Man senkt das Gefäfs so, dafs die Ätherdämpfe die Schnitte berühren, nimmt nach einigen Sekunden den Objektträger heraus und bringt ihn, wie vorher, in den Wärmeschrank oder auf das Neapler Wasserbad. Die weitere Behandlung deckt sich mit der für die erste Methode zu beschreibenden.

Das Aufkleben mittels der Schellackmethode gelingt absolut sicher, doch haftet ihr ein *Nachteil* an, der sich mir im Laufe der Jahre sehr störend bemerklich gemacht hat. *Der Schellack nimmt nämlich mit der Zeit aus der Umgebung Feuchtigkeit auf;* dadurch werden auch die Schnitte getrübt und sind dann für die mikroskopische Untersuchung nicht mehr verwendbar. Bei Präparaten also, die man jahrelang aufheben will und zu Vergleichungszwecken aufheben mufs, darf man, nach meinen jetzigen Erfahrungen, die Schellackmethode nicht mehr anwenden; bei Präparaten dagegen, die nur vorübergehend aufbewahrt werden sollen, leistet die Methode ausgezeichnete Dienste.

6) **Schällibaum'sche Kollodiumnelkenölmethode.** Man mischt 1 Raumteil Kollodium mit 3 Raumteilen Nelkenöl, streicht von dem Gemisch ein wenig auf den Objektträger, legt die Schnitte auf und bringt für 5—10 Minuten auf ein Wasserbad, damit das Nelkenöl verdampft. Hat man zuviel von der Mischung aufgestrichen, so schwimmen beim Abdampfen die Schnitte fort. *Nur für durchgefärbtes Material verwendbar;* eine Färbung *nach* dem Aufkleben ist unmöglich.

7) **Eiweifslösung.** Diese ist unstreitig *die beste aller Aufklebemethoden sowohl für einzeln zu färbende Schnitte als auch für durchgefärbtes Material.* Die Objekte müssen *in Paraffin* eingeschmolzen sein, für Celloidinschnitte ist die Methode nicht verwendbar. Die Eiweifslösung als Aufklebemittel ist von Paul Mayer *in Neapel,* dem die moderne Technik so viel verdankt, zuerst angegeben worden. Man nimmt das Weifse eines frischen Hühnereies, mifst seine Quantität im Mafscylinder, schlägt es oberflächlich zu Schnee, vermischt es mit dem gleichen Volumen reinen Glycerins und filtriert. Zur Verhütung von Fäulnis kommen einige Stückchen Kampher in die Lösung.

Will man Schnitte aufkleben, so bringt man ein ganz kleines

Tröpfchen der Eiweifslösung mit einem feinen Glasstabe auf das Deckglas (ich klebe stets auf das Deckglas auf, weil die Nachbehandlung bequemer ist als beim Aufkleben auf den Objektträger) oder auf den Objektträger und verreibt es auf demselben mit dem Finger so lange, bis Deckglas oder Objektträger nicht mehr feucht schimmern, sondern nur noch klebrig sind. Dann legt man die Schnitte sorgfältig auf Deckglas bez. Objektträger, drückt sie leicht mit dem vorhin erwähnten Hornspatel an und bringt für 10—15 Minuten Deckglas bez. Objektträger mit den Schnitten in den Wärmekasten oder auf das geheizte Neapler Wasserbad. Jetzt ist das Eiweifs geronnen und die Schnitte kleben absolut fest. Schneller kann man nach Angabe von Klebs verfahren, wenn man die Objektträger oder Deckgläser mit den aufgeklebten Schnitten ein paar Mal durch eine Spiritusflamme zieht; Objektträger hält man dabei mit der Hand, Deckgläser mit einer Cornet'schen Pinzette (von der Handlung von G. König in Berlin zu haben). Man mufs sich nur hüten, die Gläser nicht zu heifs zu machen, weil sonst die Schnitte verbrennen. Ist beim Durchziehen durch die Flamme das Paraffin geschmolzen, so ist auch das Eiweifs geronnen und die Schnitte kleben. Ich bringe aus alter Gewohnheit die aufgeklebten Schnitte nicht sofort in die das Paraffin lösende Flüssigkeit, sondern lasse erst abkühlen; doch dürfte das sofortige Einlegen des noch warmen Glases auch nicht schaden.

Hat man das Eiweifs in der oben angegebenen Weise verrieben, dann tritt später keine oder nur eine minimale Mitfärbung desselben ein. Dem Anfänger wird freilich zuerst manches Präparat mifsglücken; entweder er nimmt zu viel Eiweifs und dann hat er nach dem Färben ein schmieriges Präparat, oder er nimmt zu wenig und dann schwimmen die Schnitte fort. Hier hilft erst Übung das richtige Mafs treffen.

Unbrauchbar ist die Eiweifsmethode, wenn man mit Flüssigkeiten färben will, die alkalisch sind; dann wird das Eiweifs gelöst und die Schnitte schwimmen fort.

Zuweilen *misslingt* das Aufkleben trotz genauer Ausführung der angegebenen Vorschriften. Gewöhnlich ist dann die Eiweifslösung schlecht geworden, ohne gefault zu sein. Eine solche schlecht gewordene Lösung ist kenntlich durch ihre *bräunliche Farbe,* während eine gute nur einen leichten Stich ins Gelbe hat. Ich unterlasse es absichtlich, die mannigfachen Modifikationen der Eiweifsaufklebung, welche empfohlen sind, hier anzuführen, sie haben meines Erachtens keine besonderen Vorzüge vor der ursprünglichen Methode.

8) **Aufkleben mit destilliertem Wasser.** In neuerer Zeit hat man vielfach empfohlen, Paraffinschnitte mit destilliertem Wasser auf Deckglas oder Objektträger aufzukleben. Offenbar handelt es sich hier, da ein Klebemittel nicht verwandt wird, um *eine Wirkung der Kapillarattraktion.* Ich habe die Methode nachgeprüft und kann nur sagen, dafs sie gutes leistet, wenn man nur wenige Schnitte auf einen Objektträger bez. Deckglas bringen will, dagegen ist sie durchaus *nicht zuverlässig* bei gröfseren Serien. Bei diesen und bei sehr wertvollem Materiale würde ich von dieser Methode entschieden abraten.

Man verfährt folgendermafsen: Man reibt die Objektträger bez. Deckgläser mit einem feuchten Tuche ab, damit das Wasser nachher auf ihnen sich verteilt; darauf wird Wasser im Überschufs auf die Gläser gegeben und die Schnitte werden aufgelegt. Diese breiten sich

ohne weitere Hilfe von selber aus und werden ganz glatt. Man läfst, nachdem man die genügende Zahl Schnitte geordnet hat, das übrige Wasser ablaufen und stellt dann, um das Wasser zur Verdampfung zu bringen, *auf* den Wärmeschranken (ja nicht in denselben) und läfst hier über Nacht stehen. Die Schnitte dürfen, um festzukleben, durchaus nicht einer Temperatur ausgesetzt werden, bei welcher das Paraffin schmilzt, weil sie dabei schrumpfen.

Da hier kein Klebemittel vorhanden ist, so kann sich beim Nachfärben nichts mitfärben, und Alkalien können die Schnitte, *wenn* sie kleben, nicht ablösen, da nichts Lösbares vorhanden ist. Dies ist offenbar ein *Vorteil* der Methode.

9) **Weigert'sche Kollodiummethode.** Eine etwas umständliche Methode hat Weigert angegeben, um Schnitte von *celloidinierten Gehirnen* oder *Rückenmark*, die mit seiner Hämatoxylinfärbung behandelt werden sollen, aneinander zu kleben und sie dadurch gleichzeitig vor dem Brüchigwerden zu schützen, das in jenem Hämatoxylin stets eintritt. Die Methode bis zum Einlegen der Schnitte in die Färbeflüssigkeit besteht aus 4 Abschnitten.

1. Abschnitt. Präparation der Glasplatten. Grofse Glasplatten werden mit Kollodium überzogen, indem man auf die Mitte der wagerecht gehaltenen Platte Kollodium aufgiefst und dies gleichmäfsig nach allen Seiten laufen läfst. Man stellt dann die Platten auf die hohe Kante und läfst sie abtrocknen.

2. Abschnitt. Anfertigen der Schnittserien. Man bringt einen Schnitt auf einen Streifen Klosetpapier und legt jeden anderen Schnitt rechts daneben. Das Überführen auf das Papier geschieht so, dafs man den Streifen anspannt und unter das Messer führt, auf dem der Schnitt sich befindet. Um die Schnitte feucht zu halten, legt man den Streifen jedesmal, nachdem man einen Schnitt abgenommen, in einen flachen Teller, auf dem sich mehrere Bogen Fliefspapier befinden, die gut mit Spiritus durchfeuchtet sind. Die Oberfläche dieses Fliefspapiers darf nicht unter Spiritus stehen, da auf dieselben der Streifen mit den Schnitten kommt. Auf jeden Streifen kommt nur eine Schnittreihe.

3. Abschnitt. Ablegen der Schnitte auf die Kollodiumplatte. Hat man eine genügende Anzahl von Schnittreihen angeordnet, so legt man jeden Klosettpapierstreifen, die Schnitte nach unten, auf die Kollodiumschicht, drückt sanft an und zieht das Papier ab. Die Schnitte haften jetzt fest. Überflüssigen Spiritus entfernt man durch Absaugen mittels vierfacher Fliefspapierlage.

4. Abschnitt. Zweite Kollodiumschicht. Man gieifst jetzt rasch, damit die Schnitte nicht vertrocknen, ein zweites Mal Kollodium auf die Platte, das man wie beim ersten Male sich verbreiten läfst. Will man noch nicht färben, so kommen die Platten in 80 % Alkohol, will man aber die Färbung vornehmen, so bringt man die Platte in die Farbflüssigkeit. Jetzt löst sich die Kollodiumschicht leicht ab und man hat nun einen Kollodiumlappen, mit dem man alles anfangen kann. Nach geschehener Aufhellung schneidet man den Lappen mit der Schere so zurecht, wie man ihn braucht.

10) **Obregia'sche Photoxylinlappenmethode.** Diese Methode ist eine Modifikation der vorigen, vor welcher sie so entschiedene Vorzüge besitzt, dafs sie allein dann angewendet werden sollte, wenn man der Lappenmethode sich bedienen will. Das Verfahren ist folgendes:

Man macht sich zwei Lösungen. *Lösung A.* Gepulverter Kandiszucker wird in kochendem destilliertem Wasser gelöst, so daſs Syrupkonsistenz entsteht. Zu je 30 ccm. dieses Syrups giebt man 20 ccm. Alkohol von 95 % und 10 ccm. einer syrupdicken Lösung von reinem Dextrin.

Lösung B. Man löst 6 gr. Photoxylin in einer Mischung von 100 ccm. Alkohol absolutus und 100 ccm. reinem Schwefeläther.

Die Lösung A wird wie bei der Weigert'schen Methode auf eine Glasplatte oder einen Objektträger gegossen und horizontal gehalten, bis ihre ganze Oberfläche bedeckt ist, dann läſst man durch Schiefhaltung den Überschuſs der Lösung in das Glas zurücklaufen. Die Platte wird darauf auf die Decke eines Brütschrankes oder an einen anderen warmen Ort wagerecht hingelegt, damit sie trocknet; sie ist dabei vor Staub zu schützen. Solche Platten kann man mehrere Tage aufheben.

Die *Schnitte* ordnet man auf *satiniertem Seidenpapier*. Man schneidet sich ein Blatt von der Gröſse der Glasplatte zurecht, legt es mit der satinierten Seite nach oben in eine flache Glasschale und befeuchtet es leicht mit Alkohol von 95 %. Die Schnitte werden von dem Messer mit einem kleinen Streifen desselben Papiers abgehoben und serienweis auf dem groſsen Blatte geordnet; das Ordnen hat mit einem feuchten Pinsel zu geschehen. Ist das Papier mit einer genügenden Anzahl von Schnitten bedeckt, so hebt man es vorsichtig auf, legt es auf ein schräg liegendes Fliefspapier, damit die überschüssige Feuchtigkeit verschwindet, und bringt es dann, *die Schnitte nach unten*, auf die mit der Zuckerlösung überzogene Glasplatte. Man fährt leicht mit dem Finger über die Rückseite des Papierblattes hin, um die Schnitte anzudrücken, und entfernt dann vorsichtig das Papier. Die Schnitte kleben fest auf der Platte.

Nach etwa einer Minute gieſst man *vorsichtig* die Lösung B über die mit den Schnitten bedeckte Glasplatte und gieſst den Überschuſs des Photoxylins, der nicht wieder verwertet werden darf, weg. Man legt die Glasplatte wagerecht, damit das Photoxylinblatt gleichmäſsig dick wird, wartet, bis die leichte milchige Trübung in der Umgebung der Schnitte geschwunden ist, bezeichnet das Blatt mit etwas Ölfarbe und bringt in gewöhnliches Wasser ein. Jetzt löst sich der Zucker auf und das Photoxylinblatt hebt sich von selber ab. *Man muss aber*, darauf sei hier eindringlich hingewiesen, *unbedingt mit dem Einlegen in Wasser warten, bis die Feuchtigkeit um die Schnitte verschwunden ist;* thut man dies nicht, dann hat das Photoxylinblatt noch nicht genügend Festigkeit erlangt und schrumpft daher beträchtlich in dem Wasser.

Obregia meint, daſs *diese Methode auch für Paraffinschnitte anwendbar* ist; doch kann dies nur für Schnitte von durchgefärbtem Materiale zutreffen, für Schnittfärbung dürfte sie dagegen unbrauchbar sein, da sich das Photoxylin namentlich mit den Anilinen zu stark mitfärbt. Bei *Paraffinschnitten* verfährt man folgendermaſsen: Die Schnitte kommen direkt auf die trockne Zuckerschicht und werden mit einem Pinsel leicht angedrückt. Dann bringt man die Objektträger für 10 Minuten in den Brütschrank, in welchem sich die Schnitte ganz glatt ausstrecken. Das geschmolzene Paraffin wird mit Fliefspapier abgesaugt, die Objektträger werden in Xylol oder Terpentin gebracht, dann wieder mit Fliefspapier abgesaugt, auf kurze Zeit (einige Minuten) in absoluten Alkohol gethan, bis das Xylol oder Terpentin verdrängt ist, dann ab-

getropft und mit Lösung B übergossen. Nach 10 Minuten kann man bezeichnen und in Wasser einlegen.

Kap. VII. Die Methoden der Färbung.

a. Zweck der Färbung.

Will man einen mikroskopischen Schnitt unter dem Mikroskope betrachten, so mufs man ihn in noch zu besprechender geeigneter Weise aufhellen, damit er durchsichtig wird, denn die tierischen Organe und Gewebe sind nur an wenigen Stellen und nur bei wenigen Arten von solcher Textur, dafs sie frisch ohne weiteres für das beim Mikroskopieren gewählte durchfallende Licht durchgängig wären. An fixiertem und konserviertem Materiale ist niemals eine für wirkliche Studien (nicht blofs oberflächliche Betrachtung) genügende Durchsichtigkeit vorhanden. Würde man aber einen eben gemachten Schnitt ohne weitere Nachbehandlung aufhellen, so würde man so gut wie gar nichts sehen können, weil die Durchsichtigkeit der einzelnen Gewebsteile nunmehr infolge des Aufhellungsmittels eine so grofse geworden ist, dafs die einzelnen Strukturbilder völlig oder fast völlig verschwinden. Nur wenige Fixierungsmittel machen hier eine Ausnahme dadurch, dafs sie den Teilen eine wenn auch geringe Färbung verleihen; abgesehen von den später zu besprechenden Metallsalzen, ist es nur die Osmiumsäure und in geringem Grade auch die Chromsäure, welche neben ihren fixierenden und härtenden Eigenschaften auch Färbewirkung besitzen. Die Pikrinsäure verleiht allem eine so gleichmäfsig gelbe Farbe, dafs dadurch das Strukturbild eher verdeckt als hervorgehoben wird.

Um Schnitte bez. um fixiertes und konserviertes Material mikroskopisch verwerten zu können, mufs man daher versuchen, die einzelnen Bestandteile der Gewebe scharf hervorzuheben, und man kann dies erreichen durch die *Färbung*. *Zweck der Färbung ist also das Deutlichermachen der einzelnen Teile eines zu untersuchenden Objektes.*

Für gewisse Zwecke, z. B. rein morphologische oder embryologische, genügt es durch die Färbung darzuthun, dafs man Zellen vor sich hat, während die physiologische Bedeutung derselben und die Erkennung ihres feineren Baues im Hintergrunde des Interesses steht. Die Kerne sind diejenigen Teile der Zellen, welche sich am leichtesten färben: es reicht für die oben erwähnten Objekte völlig aus, diese durch Farbstoffe hervorzuheben, also nur *Kernfärbemittel* anzuwenden. Denn man ist sicher, dafs da, wo man Kerne antrifft, auch Zellen vorhanden sind. Die Wahl der Kernfärbemittel ist unter solchen Umständen ziemlich gleichgiltig und sie wird auf diejenigen sich lenken, die am leichtesten und sichersten zu dem gewünschten Ziele hinführen.

Weniger gleichgiltig, ja unter Umständen von ausschlaggebender Bedeutung für den Erfolg der Untersuchung ist dagegen die Auswahl der Kernfärbemittel beim Studium der Lebenserscheinungen des Zellkernes. Hier wird man genau zu prüfen haben, ob der anzuwendende Farbstoff nach den bisherigen Erfahrungen die Erwartungen zu erfüllen vermag, die man in ihn setzt, oder ob man zu anderen erprobten oder noch zu erprobenden Farbsubstanzen zu greifen hat.

Will man aber nicht den Kern, sondern die Beschaffenheit der

Zellsubstanz studieren, so mufs man solche Farbstoffe auswählen, welche *die Zellsubstanz färben.* Den meisten oder wohl allen der bekannten Plasmafarbstoffe haftet der Nachteil an, dafs sie alles diffus färben; es ist daher notwendig die Kerne der Zellen durch Kontrastfärbung hervorzuheben, um dadurch ein klareres Bild zu erhalten. Eine solche *Doppelfärbung* hat den Vorzug, dafs sie sowohl die Struktur der Zellsubstanz wie auch die des Kernes deutlich macht und sie ist daher unter vielen Umständen, wenn auch nicht immer, der einfachen Färbung vorzuziehen. Ferner verbindet sich mit dieser Färbung ein zweiter Vorteil, dafs man an geeigneten Organen (z. B. Drüsen) bei passender Auswahl der Farbstoffe die einzelnen Stadien der Zellthätigkeit, wie sie fixiert wurden, erkennen kann und damit im stande ist, einen physiologischen Vorgang in seinen verschiedenen Phasen *nebeneinander*, also in verschiedenen Zuständen, zu sehen. Aus dem Nebeneinander kann man sich das *Nacheinander* des Prozesses rekonstruieren.

Gelegentlich wird man auch, um solche physiologischen Verhältnisse, welche der direkten Beobachtung unzugänglich sind, genauer eruieren zu können, *Dreifachfärbung* anwenden. Doch wird man in der Kombination der Anzahl der Farbstoffe nicht zu weit gehen dürfen. Man erhält bei Anwendung von mehr als drei Farben so bunte Bilder, *dass man vor lauter Distinktion der Färbung nichts mehr distinguieren kann.* In dem Wirrwarr der verschiedenen Farbennüancen wird schliefslich für das Auge kein Halt mehr sein, solche bunten Bilder erscheinen zu unruhig und stehen dann meines Erachtens selbst hinter denen mit blofser Kernfärbung zurück.

Man muss sich also, um das Gesagte zusammenzufassen, *bevor man färbt, klar machen, was man mit der Färbung erreichen will.* Es ist nicht angängig, wie das vielfach von Anfängern geschieht, stumpfsinnig einen oder ein paar beliebige Plasma- oder Kernfarbstoffe auszuwählen und in diese die Schnitte oder das ganze zu untersuchende Material hinein zu werfen, sondern man hat *sorgfältig* die Leistungsfähigkeit der einzelnen Färbesubstanzen zu erwägen und darnach die Wahl zu treffen.

b. Die Arten der Färbung.

In der *industriellen* Färbetechnik unterscheidet man zwei Arten der Färbung, die man nach Bancroft als *substantive* und *adjektive Färbung* bezeichnet. Es hat sich nämlich in der Praxis der Anilinfärberei die auch für den Mikroskopiker höchst interessante und wichtige Thatsache herausgestellt, dafs diejenigen zu färbenden Stoffe, welche *tierischer* Herkunft sind (also Wolle und Seide), ohne weitere Vorbereitung, als die zum Entfetten und Bleichen nötige, die Farbstoffe aufnehmen. Diese Stoffe durchtränken sich nach gehöriger (selbstverständlicher) Reinigung, wenn sie direkt in die Färbeflüssigkeit (die sogenannte *Farbflotte*) gebracht werden, mit so viel Farbstoff, wie zur völligen Durchfärbung der Woll- bez. Seidenfaser nötig ist, und halten den Farbstoff fest. Offenbar weil hier beide *Substanzen,* zu färbende und färbende, *direkt* miteinander in Berührung gebracht werden, hat man diese Art der Färbung *substantive Färbung* genannt.

Anders verhalten sich gegen die Aniline diejenigen Stoffe, welche *pflanzlichen* Ursprunges sind, also namentlich Baumwolle und Papier.

Dieselben nehmen nicht so ohne weiteres die Farbstoffe auf bez. halten dieselben nicht fest, liefern also keine *echten* Farben. Will man Baumwolle oder Papier mit einer Anilinfarbe färben, so mufs man die Stoffe erst einer besonderen Vorbehandlung unterwerfen, bei welcher zum Stoff etwas hinzugefügt wird: daher *adjektive Färbung*. Diese Vorbehandlung nennt man den *Beizprozess*, die Substanzen, welche dazu geeignet sind, heifsen *Beizen*. Man nimmt an, dafs die Beize, welche die Baumwollenfaser oder den Papierbrei durchtränkt hat, mit dem Farbstoffe eine unlösliche Verbindung eingeht, die als *Farblack* bezeichnet wird.

Wenn wir uns nun, nach diesen Vorbemerkungen, die Methoden der Färbung betrachten, welche gewöhnlich bei histiologischen Arbeiten verwendet werden, so färben wir in den meisten Fällen *substantiv* und nur bei wenigen Stoffen, nämlich beim Hämatoxylin bez. Hämatein und bei einigen Anilinen, *adjektiv*. *Die adjektive Verwendung der Aniline soll hiermit neu in die Technik eingeführt werden.* Wir werfen gewöhnlich das ganze Material oder die Schnitte in die Farbflotte und nur zur Erreichung ganz bestimmter Absichten wird die Vorbeize angewendet.

Es könnte widerspruchsvoll erscheinen, dafs wir, die wir mit tierischen Teilen zu thun haben, auch das adjektive Verfahren anwenden. Die Berechtigung dieser Anwendung ist aber in den verschiedenen Intentionen begründet, welche Mikroskopiker und Färbereitechniker beim Färben verfolgen. Der Techniker wünscht eine *ganz gleichmässige* Färbung seiner Stoffe, und nur *die* Färbemittel und *die* Färbemethoden wendet er an, welche ihm bei möglichst geringem Kostenaufwande die möglichst gröfste Sicherheit des Erfolges versprechen. Der Mikroskopiker dagegen, wenn anders er nicht sinnlos handeln will, mufs unter allen Umständen eine ganz gleichmäfsige, d. h. diffuse Färbung vermeiden, da dieselbe ihm gar keinen Nutzen bringen kann. Seine Absicht ist vielmehr, *die Teile different zu färben*, sodafs sie in einer für das Auge leichter wahrnehmbaren Weise sich voneinander abheben, als dies im ungefärbten Zustande der Fall ist. Wenn daher die adjektive Methode eine solche differente Hervorhebung eher und besser ermöglicht als die substantive, dann ist jene und nicht diese anzuwenden.

Es ist bei Abwägung der Differenzen der Färbungszwecke noch in Betracht zu ziehen die Verschiedenartigkeit des Materiales, mit welchem Techniker und Histiologe zu thun haben. Wolle, Seide, Baumwolle etc. sind *Produkte* der tierischen bez. pflanzlichen Zelle, der Histiologe dagegen hat als Objekt *die Zelle selber* vor sich; jene Stoffe sind in ihrer Textur ganz gleichmäfsig, diese Gebilde aber unbedingt ungleichmäfsig und *diese Ungleichmässigkeit hervorzuheben ist eben der Zweck der Färbung.* Wir können und sollen daher bei dem industriellen Färbetechniker in die Schule gehen — und dies müfste in ausgiebigerem Mafse als bisher geschehen, besonders von seiten derer, welche neue Färbemethoden empfehlen — aber wir müssen das, was wir dort lernen, sinngemäfs auf unser Material anwenden. Nur so wird ein Fortschritt der histiologischen Färbetechnik möglich sein und nur so wird mehr als bisher die Wissenschaft von vielen Methoden und Rezepten verschont bleiben, die, wie es jetzt vielfach der Fall ist, nur aus Unkenntnis der färberischen Vorbedingungen gemacht und empfohlen werden.

Zu histiologischen Untersuchungen bestimmtes Material können wir in doppelter Weise der Einwirkung der Farbstoffe unterwerfen: entweder wir färben die bereits gemachten und aufgeklebten Schnitte oder wir färben das ganze zu untersuchende Stück. Die erstere Weise nennen wir *Schnittfärbung*, die letztere *Durchfärbung* oder *Stückfärbung*.

Zur *Durchfärbung* werden die Objekte aus dem 80 % oder 90 % Alkohol, in dem sie aufbewahrt sind, in die Farbstofflösung gebracht. Handelt es sich um alkoholische Lösungen, so ist eine direkte Übertragung ohne weiteres zulässig. Handelt es sich aber um wässrige Lösungen, so dürfte es nicht richtig sein, aus dem starken Alkohol direkt in dieselben die Objekte zu übertragen, da erstens durch die heftigen Diffusionsströmungen leicht Verletzungen im Innern des Präparates hervorgerufen werden könnten und ferner, weil es wässrige Farbstofflösungen gibt, aus denen der Farbstoff durch den Alkohol ausgefällt wird. Dadurch bilden sich Niederschläge von amorphen Farbstoffpartikeln im Objekt, die schwer oder gar nicht zu entfernen sind und bei der mikroskopischen Untersuchung sehr störend wirken. Muſs man wässrige Lösungen anwenden, so würde es ratsam sein, das Objekt aus dem starken Alkohol allmählich in immer schwächeren überzuführen und dann erst in die Farbflüssigkeit einzubringen.

Wie lange der Aufenthalt in der Lösung zu dauern hat, ist ganz unbestimmbar, oft genügen wenige Stunden, manchmal sind Wochen erforderlich; das richtet sich ganz nach der Natur des Objektes und nach der Färbekraft der Lösung. Wenn es langer Zeit bedarf, ehe die Färbung vollkommen, d. h. das ganze Stück von Farbe durchdrungen ist, muſs man unbedingt alkoholische Flüssigkeiten wählen. Nach der Färbung der Schnitte ist dann zu entwässern und zu montieren oder nach Stückfärbung erst langsam zu härten, zu entwässern und endlich in der gewöhnlichen Weise in Paraffin bez. Photoxylin einzuschlieſsen.

Bei *Schnittfärbung* genügt in den meisten Fällen ein Aufenthalt von 24 Stunden in der alkoholischen oder wässrigen Farbstofflösung, um den gewünschten Effekt hervorzubringen, nur selten ist längere Zeit notwendig.

Nimmt man die durchgefärbten Stücke oder die Schnitte aus der Farblösung, so zeigen sie meistens eine diffuse Färbung, sie sind, wie man sich ausdrückt, *überfärbt;* nur bei wenigen Stoffen tritt eine solche Überfärbung nicht ein. Die Aufgabe, die dem Mikroskopiker nunmehr erwächst, ist die, den überschüssigen Farbstoff aus den Objekten herauszubringen. Das gelingt unter Umständen leicht durch *Auswaschen* in Wasser oder *Ausziehen* in Alkohol, bedarf aber zuweilen eingreifender Prozeduren. Diese Entfernung des Farbstoffes nennt man *Differenzieren* und es würde sich empfehlen, diese Bezeichnung beizubehalten und nicht unnötig neue einzuführen. Man hat die Differenzierung auch als *regressive* und als *substraktive* Methode bezeichnet. Ich halte diese Ausdrücke für unglücklich gewählt und vor allem für überflüssig. Was hierbei eine regressive Veränderung erleidet, weifs ich ebensowenig, wie was hier subtrahiert werden soll. Gleichgiltig ob man substantiv imbibiert oder adjektiv einen Farblack erzeugt hat: beide Male ist zunächst eine diffuse Färbung vorhanden, die man beseitigt, um die *differenten* Teile auch *different* hervorzuheben; es ist also ganz richtig gesagt: man differenziert.

Durch- oder Stückfärbung eignet sich gut und genügt bei morphologischen und embryologischen Arbeiten und bei sehr zarten blassen Objekten; aber es ist bei derselben nicht möglich, so feine Nüancierungen wie bei der Schnittfärbung zu erhalten. Die letztere eignet sich, weil sie eine detaillierte Behandlung ermöglicht, besonders für das Studium intimerer Strukturen und physiologischer Verhältnisse; sie übertrifft, weil sie genauer ist, daher die Stückfärbung.

In neuerer Zeit ist eine von der gewöhnlichen bedeutend abweichende Methode eingeführt und ausgebildet worden, das ist die der *vitalen Färbung*. Man injiziert den Farbstoff in's lebende Tier oder behandelt die dem eben getödteten entnommenen Teile mit der Farblösung und kann dadurch ganz bestimmte Gebilde zur Anschauung bringen. Streng genommen handelt es sich nicht um eine vitale Färbung, sondern um die Färbung absterbenden Materiales. Bisher ist diese sicher zukunftsreiche Methode nur für das Nervensystem angewandt, während zur Untersuchung anderer Organe noch keine vitale Färbung existiert.

c. Die Vorbereitung zur Färbung.

Einer besonderen Vorbereitung zum Färben müssen bloss die von *paraffiniertem Materiale* angefertigten Schnitte unterworfen werden, während Celloidinschnitte ohne weiteres in die Farbflotte kommen können.

Zunächst muſs man *das Paraffin entfernen*. Die Deckgläser oder Objektträger, auf welchen die Schnitte aufgeklebt sind, kommen auf 10—15 Minuten in Terpentinöl oder auf kürzere Zeit in Xylol. Letzteres löst das Paraffin etwas schneller als ersteres, ist aber auch bedeutend teurer.

Aus dem Terpentin oder Xylol werden die Präparate in ein Schälchen mit 96 % Alkohol übergeführt. In den öligen Flüssigkeiten waren sie ganz durchsichtig geworden, im Alkohol, welcher dieselben austreibt, werden sie wieder undurchsichtig. Die Zeit, die zur Austreibung von Terpentin oder Xylol erforderlich ist, beträgt etwa 5 Minuten. Dann kommen sie in rascher Reihenfolge in 80 %, 70 %, 50 % Alkohol und endlich in den Farbstoff. Die allmähliche Verminderung der Alkoholkonzentration ist notwendig, damit die beim Einbringen in die wässrigen Farbstofflösungen entstehenden Diffusionsströmungen nicht zu heftig sind. Man kann die allmähliche Verwässerung der Schnitte aber auch dadurch erreichen, *dass man sie anhaucht*. Sie werden so sehr schonend von der wässrigen Feuchtigkeit des Atems durchtränkt und können dann in die Farblösung eingebracht werden. Nur bei Präparaten, die mit destilliertem Wasser aufgeklebt sind, möchte ich das Anhauchen widerraten, weil dadurch, wie ich zu meinem Schaden erfahren, die Schnitte sich von ihrer Unterlage lösen; sie heben sich zunächst buckelförmig hoch und schwimmen dann in der Farblösung fort.

In alkoholische Farbstofflösungen werden die Präparate direkt aus dem 96 % Alkohol übergeführt.

d. Die Farbstoffe.

α) Die substantiven Färbungen.

Ich werde in den folgenden Zeilen zunächst die einfachen Färbemittel anführen, denen die Kombinationen von zwei und mehr Farbstoffen folgen sollen.

I. Einfache Färbemittel.

A. Karmin.

J. Gerlach hat diesen wertvollen Farbstoff, den vor ihm schon die Botaniker verwandten, in die histiologische Technik eingeführt. Es existiert für die Anwendung desselben eine grofse Anzahl von Vorschriften, von denen viele, z. B. Beales Karmin, Essigkarmin, meines Erachtens nur noch historischen Wert haben. Hier sollen nur die wirklich brauchbaren oder der Prüfung werten Vorschriften Erwähnung finden.

1) **Ammoniakalisches Karmin.** 1 gr. gepulverten Karmins wird in 100 ccm. destillierten Wassers durch Zusatz von einigen Tropfen Ammoniak gelöst. Nach dem Filtrieren bleibt die Flüssigkeit in einer offenen Schale so lange an der Luft stehen, bis der Ammoniakgeruch verschwunden ist, und wird dann von neuem filtriert. Präparate, in dieser Lösung gefärbt, werden in Wasser, das mit etwas Essigsäure angesäuert ist, ausgewaschen. Man erhält eine sehr intensiv rote Färbung, doch zeigen Zellsubstanz und Kern verschiedene Nüancen. *Zur Färbung des Zentralnervensystems und zur Sichtbarmachung des Achsencylinders ist es einer der besten Reagentien.* Schnitte, die mit Eiweifs aufgeklebt sind, schwimmen in diesem Karmin fort, weil das in ihm enthaltene Ammoniak das Eiweifs löst.

2) **Lithionkarmin.** Nach der Vorschrift von Orth werden 2,5 gr. Karmin in 100 ccm. kalt gesättigter wässriger Lösung von Lithium carbonicum aufgelöst. Zur Differenzierung kommen die Schnitte direkt aus der Farbflotte für einige Zeit in salzsauren Alkohol (1 Teil Salzsäure auf 100 Teile 70 % Alkohol). Aufbewahrung beliebig. Diese Lösung ist bei Schnitten, welche mit Eiweifs aufgeklebt sind, nicht zu verwenden, da sie dasselbe auflöst.

3) **Salzsaures Karmin.** Nach P. Mayer werden 4 gr. Karmin in 15 ccm. Aqua destillata und 30 Tropfen reiner Salzsäure durch Kochen gelöst. Nach dem Erkalten werden 95 ccm. Alkohol von 96 % zugesetzt. Jetzt wird filtriert und mit Liquor ammonii caustici vorsichtig neutralisiert. Das Material kommt auf 24 Stunden und länger in die Lösung. Will man reine *Kerntinktion* haben, so wird das Material in salzsauren Alkohol (1 Salzsäure auf 1000 Alkohol 96 %) übergeführt und derselbe so lange gewechselt, bis kein Farbstoff mehr ausgeht. Will man aufser der Kerntinktion noch *Plasmafärbung*, so nimmt man zum Auswaschen reinen (also neutralen) 96 % Alkohol, der ebenfalls so lange gewechselt wird, bis er sich nicht mehr rot färbt, was oft Tage in Anspruch nimmt. Für Schnittpräparate ist dies

Karmin nicht geeignet, da das Eiweifs sich sehr stark mitfärbt; *für Durchfärbung vorzüglich.*

4) **Alkoholisches Boraxkarmin.** Nach Grenacher kocht man 2—3 gr. Karmin mit 4 gr. Borax in 100 ccm. Aqua destillata und fügt nach dem Erkalten das gleiche Volumen 96 % Alkohol zu; dann wird filtriert. Die Objekte kommen auf 1—3 Tage und noch länger, bis sie völlig durchzogen sind, in die Lösung und dann direkt in salzsauren Alkohol (1 pro mille) von 96 %. Hier bleiben sie so lange, bis kein Farbstoff mehr ausgeht. Man darf das Differenzieren in dem salzsauren Alkohol nicht zu früh unterbrechen; der Farbstoff schlägt sich nämlich zunächst in amorpher Form im Gewebe nieder, wird durch die Salzsäure gelöst und entfaltet dann erst seine färbende Kraft. Bei vorzeitiger Unterbrechung der Differenzierungen trifft man daher die Gewebe mit Farbstoffpartikeln erfüllt. Aus dem sauren Überführen in neutralen Alkohol. *Nur zum Durchfärben geeignet. Gute Kern- und leichte Plasmafärbung.*

5) **Wässriges Boraxkarmin.** Grenacher kocht 2 gr. Borax mit $^3/_4$—1 gr. Karmin in 100 ccm. Aqua destillata. Nach dem Erkalten vorsichtiges und tropfenweises, unter stetem Umrühren, Zusetzen von Essigsäure, bis die Färbung des ammoniakalischen Karmins erreicht ist. War das Karmin nach dem Kochen nicht klar gelöst, so mufs vor dem Essigsäurezusatz filtriert werden. Nach dem Essigsäurezusatz überläfst man die Lösung 24 Stunden sich selber und filtriert durch ein mehrfaches Filter. Die Filtration geht sehr langsam vor sich. *Nur zur Schnittfärbung geeignet.* Die Schnitte bleiben in der Farblösung 5 Minuten bis 24 Stunden. Dann werden sie flüchtig in destilliertem Wasser abgespült und mit salzsaurem Alkohol (1 pro mille) von 96 % so lange behandelt, bis keine Farbstoffwolken mehr aus den Schnitten entweichen. Auch hier ist ein zu frühzeitiges Unterbrechen der Differenzierung aus denselben Gründen wie bei der vorigen Lösung zu vermeiden. *Gute Kern-, schwache Plasmafärbung.*

6) **Wässriges Alaunkarmin.** Grenacher, dem wir auch diese Vorschrift verdanken, empfiehlt 3 gr. gepulverten Alauns mit 1 gr. Karmin in der Reibschale zu verreiben und dann in 100 ccm. Wasser 10—20 Minuten zu kochen; nach dem Erkalten wird filtriert. Die Lösung mufs, wenn sie länger aufbewahrt werden soll, häufiger filtriert werden; zur Verhütung der Schimmelbildung setzt man etwas Carbolsäure zu. *Ich* nehme statt des gepulverten Alauns jetzt *Aluminiumammoniumsulfat* (von Kahlbaum), das leichter löslich ist, als die übrigen hier in Betracht kommenden Alaune. *Nur zur Schnittfärbung geeignet.* Die Schnitte bleiben in der Lösung 10 Minuten bis 24 Stunden; Auswaschen in Wasser; Art des Aufhebens gleichgiltig. *Es tritt nie Überfärbung ein.* Dies Reagens ist eins der besten *Kerntinktionsmittel;* es färben sich in ihm die *Kerne violett; Muskelfasern, Knochengrundsubstanz* und *Mucin rötlich.*

7) **Alkoholisches Alaunkarmin.** v. Mährenthal setzt zur Verhütung der Schimmelbildung zu 4 Vol. des Grenacher'schen Alaunkarmins 1 Vol. 96 % Alkohol. Man mufs warten, bis kein Karmin und Alaun nach dem Alkoholzusatz mehr ausfallen und dann filtrieren. *Nur Schnittfärbung;* Auswaschen in Wasser.

8) **Urankarmin.** Schmaus verreibt 1 gr. karminsaures Natron mit

0, 5 gr. Uranum nitricum, kocht $^1/_2$ Stunde in 100 ccm. Wasser und filtriert nach dem Erkalten. Es soll sich diese Lösung für *Rückenmark* eignen, das in Müller'scher Lösung gelegen hat und ohne Auswaschen in Alkohol gehärtet wurde; namentlich gut für *Axencylinderfärbung*. Dauer der Färbung 15—20 Minuten bis 24 Stunden, *keine Überfärbung*. Bei anderen Objekten als *Grundlage zu einer Doppelfärbung mit Hämatoxylin*.

9) **Karminsäure.** P. Mayer hat festgestellt, dafs die färbende Substanz in dem käuflichen Karmin die *Karminsäure* ist; dieselbe ist von Grübler in Leipzig zu beziehen. Statt der in ihren Wirkungen unsicheren Karmine — man kann nämlich kaum zwei Karmine des Handels finden, welche gleiche Färbekraft haben — verwendet daher genannter Forscher nur noch die Karminsäure nach zwei Vorschriften, von denen die eine Grenacher's Alaunkarmin, die andere Grenacher's alkoholisches Boraxkarmin ersetzen soll. Die erstere ist das

9[a]) **Karmalaun.** 1 gr. Karminsäure und 10 gr. Alaun werden durch Erwärmen in 200 ccm. Aqua destillata gelöst. Nach dem Erkalten wird klar abgegossen oder filtriert. Zur Verhütung der Schimmelbildung setzt man einige Thymolkrystalle zu. *Schnittfärbung.*

10) **Parakarmin.** P. Mayer bringt 1 gr. Karminsäure, $^1/_2$ gr. Chloraluminium und 4 gr. Chlorcalcium in 100 ccm. 70 % Alkohol, löst entweder kalt oder warm und filtriert nach dem Absetzen. *Schnittfärbung und Stückfärbung möglich.* Ausziehen in saurem Alkohol unnötig.

11) **Alauncochenille.** Nach Czokor werden 7 gr. Cochenille und 7 gr. gebrannten Alauns zu einem Pulver zerrieben, in 700 ccm. Aqua destillata gekocht und schliefslich bis zu 400 ccm. eingedickt. Sehr häufiges Filtrieren nötig. Zur Verhütung von Schimmelbildung sind einige Krystalle von Thymol in die Lösung zu bringen. Zum *Durchfärben* und *Schnittfärben* geeignet. *Gute Kern-, leichte Plasmafärbung.*

B. **Hämatoxylin.**

Zur substantiven Färbung verwendet man das Hämatoxylin stets in einer Lösung, welche Alaun enthält. Die frisch bereiteten Lösungen sind gewöhnlich sehr hell violett und haben eine aufserordentlich geringe Färbekraft; diese erlangen sie erst nach längerem Stehen, wobei die Farbe, wie man beim Schütteln erkennt, einen Stich ins Rote hat. Man sagt: das Hämatoxylin mufs *ausreifen*. Dieser Reifeprozefs beruht aber offenbar auf einer Zersetzung des Farbstoffes, welche unter der Einwirkung des Lichtes und des Sauerstoffs der Luft eintritt. Wie P. Mayer nachgewiesen hat, ist die wirksame Substanz des Hämatoxylins das *Hämatein*, dessen Darstellung nach den Vorschriften in dem Lehrbuche von Regnault-Strecker, mit denen sich die Angaben von P. Mayer decken, eine so komplizierte ist, dafs man gut thut, sich die Substanz bei Grübler zu besorgen. Nimmt man Hämatein statt Hämatoxylin, so hat man den aufserordentlichen Vorteil, dafs die Lösungen sofort verwendbar sind, während die Reifung des Hämatoxylins oft Wochen dauert. Im übrigen haben Hämatoxylin- und Hämateinlösungen genau dieselben färberischen Eigenschaften.

Hämatoxylin und Hämatein in Alaunlösungen sind wesentlich *Kernfarbstoffe,* doch wird auch das Plasma leicht gebläut. Eine besondere Affinität besitzen sie zum *Mucin,* das sich in ihnen ganz intensiv veilchenblau färbt. Das Hämatoxylin (Hämatein) kann bei substantiver Anwendung geradezu als ein mikrochemisches Reagens auf Mucin angesehen werden.

In den Alaunhämatoxylinen (-hämateinen) tritt sehr leicht Überfärbung ein; man muſs daher den Färbeprozeſs genau abpassen und, ist die Färbung zu intensiv ausgefallen, in Essigsäure haltigem Wasser differenzieren. Vor dem definitiven Aufheben der Präparate müssen dieselben sorgfältig neutralisiert werden, was durch Auswaschen der Säuren geschieht, sonst blassen die Schnitte mit der Zeit aus. Ich rate daher auch, zur Aufhellung — um das hier vorweg zu nehmen — kein Nelkenöl zu nehmen, weil dasselbe meist sauer ist, sondern Bergamottöl zu verwenden. Auch dem Lichte dürfen in Hämatoxylin bez. Hämatein gefärbte Präparate nicht dauernd ausgesetzt werden, weil sie sich sonst entfärben. Ich gebe jetzt die einzelnen Vorschriften für die alaunhaltigen Lösungen.

12) **Böhmer'sches Hämatoxylin.** 1,5 gr. Hämatoxylin werden in 30 ccm. Alkohol absolutus gelöst. Davon kommen so viel Tropfen in eine Lösung von 0,1 gr. Alaun in 30 ccm. Aqua destillata, bis eine schöne violette Färbung entsteht. Durch Offenstehenlassen der Flasche kann man den „Reifungsprozeſs", der sonst Wochen erfordert, beschleunigen. *Nur Schnittfärbung; Färbungsdauer* bis 5 Minuten.

13) **Delafield'sches Hämatoxylin** (fälschlich Grenacher'sches Hämatoxylin genannt). 4 gr. Hämatoxylin werden in 25 ccm. absoluten Alkohols gelöst und kommen dann in 400 ccm. einer konzentrierten wässrigen Ammonalaunlösung. Man läſst die Mischung 3 bis 4 Tage offen am Lichte stehen, filtriert und fügt je 100 ccm. Glycerin und Methylalkohol zu, läſst einige Zeit stehen und filtriert von neuem. Zum Gebrauch wird ein Quantum davon nach Belieben mit Wasser verdünnt. Für *Schnittfärbung.*

14) **Glycerinalaunhämatoxylin.** *Ich habe mir,* um den Alkohol bei der Zubereitung des Farbstoffes zu vermeiden und um die Färbung etwas zu *verlangsamen, folgende Lösung hergestellt,* die mir stets gute Resultate gegeben hat, an deren Stelle ich aber jetzt eine ähnliche von Hämatein verwende. 1 gr. Hämatoxylin und 1 gr. gepulverten Alauns werden in 65 ccm. Aqua destillata und 35 ccm. Glycerin gelöst. Man schüttelt im Anfange häufig um, muſs aber dann 14 Tage warten, bis alles vollständig gelöst ist. Die Färbung mit dieser *meiner* Lösung zeigt einen glänzenderen und leuchtenderen Ton, als er nach Anwendung von Böhmer'schem Hämatoxylin erreicht wird. *Nur für Schnittfärbung geeignet. Färbungsdauer* bis 8 Minuten.

15) **Ehrlich'sches Hämatoxylin.** 2 gr. Hämatoxylin werden in 10 ccm. Eisessig, je 100 ccm. Glycerin, Alkohol absolutus und Wasser gelöst und Alaun im Überschuſs hinzugefügt. *Stückfärbung* und *Schnittfärbung* möglich; Überfärbung tritt selten ein.

16) **Chloralhämatoxylin nach Gage.** Man löst 7,5 gr. Kali- oder Ammonalaun in 200 ccm. kochenden destillierten Wassers, setzt nach dem Abkühlen so viel gekochtes destilliertes Wasser zu, daſs die 200

ccm. voll sind, dann fügt man 4 gr. Chloralhydrat und nach dessen Auflösung 10 ccm. Alkohol von 96 % hinzu, in dem 0,1 gr. Hämatoxylin gelöst war. Nach 1—2 Wochen hat die Mischung eine purpurne Färbung. *Schnittfärbung. Färbungsdauer* 1—5 Minuten. Zuweilen treten Farbstoffkörnchen im Präparate auf, dann muſs gekocht und filtriert werden. Dieser Übelstand, daſs amorphe Farbpartikelchen im Präparate sich zeigen, haftet nach meinen Erfahrungen auch dem Böhmer'schen Hämatoxylin an, *während er bei dem nach meiner Vorschrift hergestellten sich nie bemerkbar gemacht hat.*

17) **Kleinenberg'sches Hämatoxylin.** Man macht drei Lösungen: 1) gesättigte Lösung von krystallisiertem Chlorcalcium in 70 % Alkohol, dazu soviel Alaun, wie sich lösen will; 2) gesättigte Lösung von Alaun in 70 % Alkohol. Lösung 2 wird mit Lösung 1 im Verhältnis 8 : 1 gemischt. 3) Konzentrierte Lösung von Hämatoxylin entweder in Alkohol oder in der Lösung 1. Von der Lösung 3 werden einige Tropfen zu der Mischung von 1 und 2 gegeben. *Nur zum Durchfärben säurefreier Objekte.*

18) **Mayer's Hämalaun.** Man löst nach Paul Mayer 1 gr. Hämatein in 50 ccm. Alkohol von 90 % unter Erwärmen und gieſst die Lösung zu einer Lösung von 50 gr. Alaun in 1 Liter destillierten Wassers. *Für Schnitte,* wie Böhmer'sche Lösung.

19) **Glycerinalaunhämatein.** *Ich habe mir eine Lösung* nach dem Muster meiner Hämatoxylinlösung in folgender Weise *hergestellt:* 0,5 gr. Hämatein wird in 100 ccm. Aqua destillata unter Erwärmen gelöst, in die noch warme Flüssigkeit kommen 3 gr. Aluminiumammoniumsulfat von Kahlbaum; nach dem Erkalten füge ich 100 ccm. Glycerin hinzu. Ein Filtrieren ist nicht notwendig. *Nur für Schnittfärbung; Färbungsdauer* — 5 Minuten und länger, bis die gewünschte Intensität erreicht ist. *Sorgfältiges Auswaschen in Wasser.*

20) **Hämacalcium nach Paul Mayer.** 1 gr. Hämatein und 1 gr. Chloraluminium werden fein zerrieben; das Pulver bringt man in ein Gemisch von 600 ccm. 70 % Alkohol und 10 ccm. Eisessig; nach der Lösung, die kalt oder warm vorgenommen werden kann, fügt man 50 gr. Chlocalcium hinzu. *Nur zum Durchfärben.* Ein Differenzieren in saurem Alkohol ist nicht nötig; sind die Präparate zu rot, so kann man sie bis zur Erreichung der gewünschten Farbennüance in eine 2 % alkoholische Lösung von Chloraluminium bringen.

C. Die Anilinfarbstoffe.

Seit Waldeyer und Frey im Jahre 1863 gleichzeitig und unabhängig von einander das Fuchsin für histiologische Zwecke zuerst verwandten, ist eine Überfülle von Anilinfarben von den verschiedensten Forschern empfohlen worden, so daſs wir gegenwärtig daran an einem „Embarras de richesse" leiden. Ich kann mich des Eindruckes nicht erwehren, daſs viele von den Empfehlungen zurückzuführen sind teils auf eine ungenügende Kenntnis der Synonyme der Farbstoffe, teils auf die persönliche Liebhaberei und den individuellen Geschmack des betreffenden Forschers. Nur so läſst es sich erklären, daſs eine Masse von Färbungsrezepten neu in Umlauf kommen, welche gar keinen Vorteil vor den bekannten voraus haben. Man sollte aber nur dann eine

Methode veröffentlichen, wenn dieselbe entweder wirklich Neues bringt oder das Alte leichter und sicherer zeigt, als dies bisher möglich war.

Ich bringe in den folgenden Zeilen nur die Vorschriften für die Verwendung der gebräuchlichsten Aniline und soweit dieselben für *alle* Untersuchungen verwendbar sind. Die weniger gebräuchlichen Stoffe und die nur für bestimmte Zwecke gegebenen Vorschriften werden im zweiten Abschnitte dieses Buches, wenn ich von der Anwendung der Methoden handeln werde, Unterkunft finden.

Die Methode der substantiven Verwendung der Anilinfarben ist zuerst durch E. Hermann und Flemming und durch Ehrlich gründlich ausgearbeitet worden, von den ersteren für histiologische, von dem letzteren namentlich für bakteriologische Zwecke. Das Prinzip ist kurz das der *maximalen Überfärbung* und der darauf folgenden *maximalen Entfärbung*. Man zieht aus den gefärbten Objekten in geeigneter Weise so viel Farbstoff aus, als sich ausziehen läfst; man differenziert also. Was dann bei mikroskopischer Betrachtung sich gefärbt zeigt, hat anscheinend eine Affinität zu dem gewählten Farbstoffe.

Aus der Bakteriologie ist in die Histiologie ein Verfahren importiert worden, das für manche Zwecke ganz gute Dienste leisten kann. *Es wird* nach seinem Entdecker *das* Gram'sche *Verfahren genannt* und besteht darin, dafs man die in einer Anilinfarbe tingierten Schnitte in Lügol'sche *Lösung* — 1 gr. Jodum purum, 2 gr. Jodkalium, 300 ccm. Wasser — für längere oder kürzere Zeit einbringt, auswäscht und nun in Alkohol auszieht. Man erhält dann stets eine *gute Kernfärbung*. Es ist dabei gleichgiltig, ob man eine wässrige oder verdünnte alkoholische oder mit Anilinöl angesetzte Lösung des Farbstoffes gewählt hat.

Ich führe nunmehr die einzelnen Farblösungen an.

21) **Fuchsin.** Man hält sich eine gesättigte alkoholische Lösung des Fuchsins (grofse Krystalle) vorrätig und verdünnt einen Teil derselben unmittelbar vor dem Gebrauche mit dem gleichen Quantum destillierten Wassers. Man färbt die Schnitte 24 Stunden lang und bringt sie dann sofort in Alkohol von 96 %, der so oft gewechselt wird, bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. *Intensive Färbung der chromatischen Substanz des Kernes, leichte Plasmafärbung, intensive Färbung des Mucins und der Knorpelgrundsubstanz.* Farbenton rotviolett. Will man *nur Kernfärbung* haben, so nimmt man wenige Tropfen der alkoholischen Stammflüssigkeit und verdünnt mit viel destilliertem Wasser. Direktes Übertragen in 96 % Alkohol und langes Ausziehen in demselben. Fuchsin ist schwer von den Glasgefäfsen, in denen man färbt, zu entfernen; man kann dieselben nur in starker Salpetersäure reinigen, durch welche das Fuchsin entfärbt wird.

22) **Fuchsin** *nach* Nissl. Dieser Autor empfiehlt in gesättigter wässriger Fuchsinlösung — er gibt zwar *Magenta* an, dieser Name ist aber nur ein Synonym für Fuchsin — die Schnitte zu erhitzen, bis die erste Dampfbildung erfolgt; dann Auswaschen in Alkohol und definitive Differenzierung in Nelkenöl.

23) **Safranin.** Man hält sich, wie bei dem Fuchsin, eine Stammlösung vorrätig, die man durch Einbringen von Safranin in 96 % Alkohol bis zur Sättigung herstellt. Zum jedesmaligen Gebrauche verdünnt man ein kleines Quantum derselben mit der gleichen Menge

destillierten Wassers. In der Farbflotte bleiben die Schnitte einige Stunden bis 1 Tag. Färbt man lange, so bekommt man aufser *Kern-* auch *Plasmafärbung*. Die chromatische Substanz der *Kerne* ist leuchtend rot geworden, das *Plasma* hat einen schmutzig violetten Ton bekommen. Intensiv violett gefärbt ist auch bei langer Behandlung das *Mucin* und die *Knorpelgrundsubstanz*. Will man die Färbung auf die Kerne beschränken, so kann man, wie vielfach empfohlen wird, die Präparate statt in reinem Alkohol, in welchen sie aus der Farblösung stets zu bringen sind, in salzsaurem Alkohol ausziehen. Doch mufs man dabei sehr vorsichtig verfahren, sonst erhält man statt des leuchtenden Rots ein unangenehm schmutziges Violett. Das Safranin, dessen ich mich bediene und das aus der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik stammt, ist ungemein säureempfindlich, so dafs ich für dieses Präparat die Anwendung von Salzsäure entschieden widerrate.

Will man die violette Nebenfärbung vermeiden und nur den leuchtend roten Ton erhalten, so färbt man in einer sehr verdünnten Lösung; man nimmt nur wenige Tropfen der alkoholischen Stammlösung und giebt soviel destilliertes Wasser zu, dafs eine rosarote Farbennüance entsteht. Hierin werden Mucin und Knorpelgrundsubstanz sowie die Chromosomen der Kerne leuchtend rot. Man bringt nach 24 Stunden in Alkohol von 96 % und differenziert darin so lange, bis keine Farbwolken mehr aus den Schnitten entweichen; dann ist die Zellsubstanz ganz entfärbt.

24) **Safranin** *nach* Babes. Safranin 2 gr., Aqua destillata 100 ccm., Anilinöl 3 ccm. Man färbt 5 Minuten bis einige Stunden, zieht in Alkohol von 96 %, in welchen direkt übertragen wird, aus. Bei diesem Safranin wie bei dem vorigen kann das Gram'sche *Verfahren* angewendet werden.

25) **Säurefuchsin.** Man kann das Säurefuchsin, welches nicht identisch ist mit dem Fuchsin, in konzentrierter wässriger Lösung oder in Anilinwasser gelöst verwenden. *Anilinwasser stellt man sich nach* Ehrlich *folgendermassen dar*: Man gieſst in ein Reagensglas mit destilliertem Wasser Anilinöl, schüttelt kräftig durch, so dafs sich das Öl verteilt, und filtriert durch ein mit Wasser *befeuchtetes* Filter. Das filtrierte Wasser ist klar, riecht aber stark nach Anilinöl. In 100 ccm. Anilinwasser löst man 20 gr. Säurefuchsin und färbt damit kalt oder in der Wärme. Diese Lösung ist von Altmann zur Erkennung seiner Kerngranula empfohlen worden (cf. Abschnitt II).

Weigert empfahl das Säurefuchsin zum Studium des Zentralnervensystems; *diese* Weigert'sche *Methode* ist sehr kompliziert. Die Schnitte von Gehirnen, die in Müller'scher Lösung fixiert und nachher in Alkohol gehärtet waren, kommen auf Stunden oder Tage in eine gesättigte wässrige Lösung von Säurefuchsin. Dann werden sie in Wasser abgespült und in eine alkoholische Kalilauge gebracht. Diese letztere stellt man sich so dar, dafs man in 100 ccm. Alkohol absolutus 1 gr. Kali causticum fusum wirft, 24 Stunden wartet, bis das, was löslich ist, gelöst ist. Von dieser Stammflüssigkeit verdünnt man 10 ccm. mit 100 ccm. Alkohol absolutus. In dieser Verdünnung wird der Schnitt bewegt, wobei er sofort Farbstoff verliert; das Bewegen wird so lange fortgesetzt, bis die graue Substanz hervortritt. Dann wird wiederholt in reinem Wasser abgewaschen, bis keine Farbstoffwolken mehr aus-

gehen. Die Färbung ist gelungen, wenn die weifse Substanz rot, die graue hell ist. *Nur die Nervenfasern sind dann gefärbt.*

26) **Dahlia** (*Methylviolett* R., cf. Anhang zu diesem Kapitel). Nach Ehrlich stellt man sich eine Lösung in folgender Weise dar: Alkohol absolutus 50 ccm., Aqua destillata 100 ccm., Acetum glaciale $12^1/_2$ ccm., Dahlia bis zur Sättigung. Die Schnitte, *die nur von Präparaten genommen werden dürfen, die in absolutem Alkohol fixiert waren*, kommen für mindestens 12 Stunden in die Lösung. Einlegen in Terpentin. *Zum Studium der Mastzellen.*

27) **Gentianaviolett.** Man stellt sich eine konzentrierte wässrige Lösung her — eine „undurchsichtige" Lösung, wie sie Flemming nennt —, in welcher die Schnitte 24 Stunden bleiben; dann werden sie in Wasser abgespült und in Alkohol ausgezogen. *Färbung* wie nach Safranin und Fuchsin.

29) **Gentianaviolett** *nach* Ehrlich. 1 gr. Gentianaviolett, Alkohol 15 ccm., Anilinöl 2 ccm., Aqua destillata 15 ccm. In dieser Lösung bleiben die Schnitte 5—15 Minuten und werden *mit dem* Gram'schen *Verfahren* nachbehandelt. Es sei hier noch bemerkt, dafs *alle Lösungen*, welche *Anilinöl* enthalten, *schlecht haltbar sind*; man darf daher nicht zuviel von denselben sich auf Vorrat anfertigen.

29) **Bismarckbraun.** In konzentrierter wässriger Lösung wird das Präparat 24 Stunden lang gelassen, dann flüchtig in Wasser abgewaschen und so lange in Alkohol von 96 % extrahiert, bis kein Farbstoff mehr entweicht. Färbt *Kerne* und *mucinhaltige Drüsen* dunkelbraun. Die *Zellsubstanz* wird hellbraun, ebenso *Bindegewebsfibrillen. Muskeln*, glatte und quergestreifte, sowie die *Zellen der Eiweissdrüsen* werden strohgelb. Einer der vorzüglichsten Farbstoffe, für dessen Anwendung die vorhergegangene Fixierungsmethode meist gleichgiltig ist; nur Flemming'sche Lösung macht ihn unwirksam.

30) **Eosin.** Färbt in konzentrierter wässriger Lösung *Zellsubstanzen, Muskeln, rote Blutkörperchen*, sowie das Sekret der *Eiweissdrüsen* tiefrot. *Reiner Plasmafarbstoff*, daher nur verwendbar als Grundlage für Doppelfärbungen.

31) **Orange G.** Färbt in gesättigter wässriger Lösung *Muskeln* hellgelb, *Zellsubstanzen* hellorange. *Plasmafarbstoff* wie Eosin. Orange G in Lösung schimmelt leicht, darf daher nicht in zu grofsen Quantitäten vorrätig gehalten werden.

II. Farbenkombinationen.

Karmin-Hämatoxylin.

32) **Hämatoxylin-Karmin** *nach* Strelzoff. Nur geeignet *für Präparate sich entwickelnder, vorher entkalkter Knochen.* Schnitte in Alaunhämatoxylin gefärbt, in destilliertem Wasser ausgewaschen und dann in eine möglichst ammoniakarme Karminlösung gebracht. Sie werden wiederum ausgewaschen und können nochmals in dünne Alaunlösung gebracht werden. *Knorpel blau, Knochen rot.* Die Präparate sind nicht haltbar.

33) **Karmin-Hämatoxylin** *nach* G. Fritsch. Man stellt sich zunächst eine Stammflüssigkeit von Karmin her, indem man so viel Karmin in Ammoniak löst, als sich lösen kann; dann läfst man das Ammoniak verdunsten. Von dieser Lösung, die nicht filtriert werden darf — sie bleibt so wie so klar —, wird zum jedesmaligen Gebrauche ein kleines Quantum mit Wasser verdünnt, die die Lösung enthaltende Glasschale auf eine weifse Unterlage gestellt und die Lösung mit einem in Essigsäure getauchten Glasstabe umgerührt. Die kirschrote Farbe wird jetzt hellrot und es kommt ein gelber Ton hinein, ein Zeichen, dafs das Karmin neutralisiert ist. In dieser Lösung werden die Schnitte bis zu 1 Stunde gerärbt. Die Nachfärbung mit Hämatoxylin darf nicht zu lange ausgedehnt werden, sonst wird die Karminfärbung verdrängt. *Nur für Schnittpräparate. Zellsubstanzen* rot, *Kerne* blau. Die Färbung ist haltbar.

Zwei Karmine.

34) **Boraxkarmin — Indigkarmin** *nach* Norris- *und* Shakespeare. Man macht durch Kochen eine Lösung von 2 gr. Karmin, 8 gr. Borax und 130 ccm. Aqua destillata und eine zweite von 8 gr. Indigkarmin, 8 gr. Borax und 130 ccm. Aqua destillata. Nach dem Erkalten filtriert man beide und mischt sie zu gleichen Teilen. *Nur für Schnittpräparate.* Schnitte von Alkohol —, Pikrinsalpetersäure — oder Sublimatpräparaten werden 24 Stunden in der Mischung gefärbt, kommen dann *direkt* in kalt gesättigte wässrige Oxalsäurelösung für 15—20 Minuten, werden gut ausgewaschen und weiter behandelt. Vor der Oxalsäurewirkung dürfen die Schnitte nicht mit Wasser in Berührung kommen, weil sonst das Indigkarmin entweicht. Aus demselben Grunde darf keine dünne Oxalsäure genommen werden. *Das Resultat der Färbung ist ein ganz ausgezeichnetes.* Die *Kerne* sind tiefrot, die *Bindegewebsfibrillen* hellrot, das *Plasma der Epithelien* grünlich und *Muskeln,* glatte wie quergestreifte, leuchtend blaugrün. Namentlich zur Unterscheidung von Muskelfasern und Bindegewebsfibrillen bei *Wirbellosen* erhält man höchst instruktive Bilder. *Ich kann diese Färbungsmethode auf das angelegentlichste empfehlen.* Die Mischung hält sich längere Zeit.

Karmin-Aniline.

35) **Pikrokarmin-Ranvier.** (Da das Pikrin ein Anilinfarbstoff ist und zwar ein Nitrofarbstoff, so sind die Pikrokarmine hier zu rubrizieren). Der bekannte französische Histiologe hat zuerst diese Doppelfärbung ersonnen, die viel gelobt und viel angewendet wird. Mir erscheint die Doppelfärbung ziemlich problematisch. Das Pikrin entweicht meistens rapide aus dem Gewebe, mag man nun in Wasser auswaschen oder direkt in Alkohol einbringen, welch letzteres immerhin bedenklich ist, da sich dann leicht amorphe Karminniederschläge bilden.

Die Ranvier'sche *Vorschrift* lautet folgendermafsen: In eine ammoniakalische Karminlösung wird kalt gesättigte wässrige Pikrinlösung eingetragen und das Gemisch auf $^1/_5$ des Volumens eingedampft. Nach dem Abkühlen wird filtriert und wieder abgedampft, bis das Pikrokarmin als krystallinisches Pulver ausfällt. Mit einer $1\,^0/_0$ wässrigen Lösung dieses Pulvers wird gefärbt. Die Vorbehandlung der Präparate ist gleichgiltig.

36) **Pikrokarmin-Weigert.** Zu 2 gr. Karmin kommen 4 ccm. Ammoniak; nach 24 Stunden werden 200 ccm. kalt gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung hinzugefügt. Nach ferneren 24 Stunden Essigsäurezusatz, bis ein stärkerer Niederschlag entsteht, dann wird Ammoniak tropfenweise zugefügt, bis die Lösung klar ist. Dies Pikrokarmin liefert Grübler in Lösung und in Substanz.

37) **Pikrokarmin-Hoyer.** 1 gr. Karmin wird in einer Mischung von circa 1—2 ccm. starker Ammoniaklösung und 6—8 ccm. Wasser gelöst und in einem Glaskolben im Sandbade so lange erwärmt, bis das überschüssige Ammoniak sich verflüchtigt hat. Man erkennt das Eintreten der Verflüchtigung daran, dafs in der erwärmten Flüssigkeit *kleine Bläschen* aufsteigen und die *Farbennüance hellrot* ist. Nach dem Erkalten wird filtriert. Zu dieser neutralen Karminlösung wird das 4—6fache Volumen starken Alkohols zugesetzt; dadurch entsteht ein hellroter Niederschlag. Man filtriert, wäscht den auf dem Filter zurückbleibenden Niederschlag und trocknet ihn zu einem *Pulver* oder bereitet durch Übergiefsen mit Alkohol, in welchem etwas Glycerin und Chloral gelöst ist, eine *Paste*. Man löst nun, um Pikrokarmin zu erhalten, Pulver oder Paste in einer konzentrierten Solution von neutralem pikrinsaurem Ammoniak. Durch das Grübler'sche Institut in Pulverform oder Lösung zu beziehen. Das Hoyer'sche Pikrokarmin dient infolge seines Gehaltes an pikrinsaurem Ammoniak *zur Fixierung der vitalen Methylenblaufärbung*.

38) **Pikrolithionkarmin-Orth.** Zu 1 Teil einer 2,5 % Lithionkarminlösung (cf. Nr. 2 dieses Kapitels) werden 2—3 Teile kalt gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung hinzugefügt. Sollte eine der beiden Farbennüancen zu sehr vorwiegen (rot oder gelb), so kann man beliebig von der minder hervortretenden Lösung zusetzen.

Die Pikrokarmine färben die *Zellkerne* knallrot, *Epithel- und Drüsenzellen* sowie *Muskeln* gelb, *Bindegewebe* gar nicht.

39) **Boraxkarmin-Bleu de Lyon** *nach* Blochmann. Die Präparate werden zunächst in Boraxkarmin durchgefärbt. Die aufgeklebten Schnitte werden dann in Bleu de Lyon nachgefärbt. Die Lösung des letzteren Farbstoffes macht man zunächst in Wasser und setzt dann so viel Alkohol zu, dafs sie von letzterem 10 % enthält. In dem blauen Farbstoffe bleiben die Schnitte, bis sie blau sind, und werden dann in Alkohol ausgezogen. Ist die Färbung gelungen, dann ist das *Plasma* blau, die *Kerne* rot. Zum Gelingen der Färbung ist es notwendig, dafs die Schnitte nicht zu lange im Lyoner Blau bleiben, sonst wird das Karmin durch das Anilin völlig verdrängt.

40) **Orange G-Alaunkarmin.** Man färbt 24 Stunden in konzentrierter wässriger Lösung von Orange G, bringt dann auf 10 Minuten in Grenacher's Alaunkarmin, wäscht in Wasser aus und bringt in Alkohol etc. *Nur für Schnittpräparate. Ich habe diese Kombination zuerst* beim Studium von Drüsen *angewendet* und kann sie nur empfehlen. *Zellsubstanz* orangegelb, *Kern* rot, *Mucin* intensiv rotviolett. Vorherige Fixierung Pikrinsalpetersäure oder Sublimat.

Hämatoxylin-Aniline.

41) **Hämatoxylin-Safranin** *nach* Rabl. Die Schnitte werden zuerst in Delafield'schem Hämatoxylin so schwach gefärbt, dafs sie ohne

weiteres nicht brauchbar sind. Sie werden gut ausgewaschen und kommen in Safranin (alkoholische gesättigte Lösung zum Gebrauch mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt). Hierin bleiben die Präparate 24 Stunden und werden dann so lange in Alkohol absolutus extrahiert, bis kein Farbstoff mehr entweicht. *Zum Studium von Zellteilungen*; das Material mufs in Chromameisensäure nach Rabl (cf. Kap. III Nr. 4) fixiert sein.

42) **Eosin-Hämatoxylin** *nach* Renaut. Konzentrirte wässrige Eosinlösung 30 ccm., abgestandene gesättigte Lösung von Hämatoxylin in Alkohol 40 ccm., mit Kalialaun gesättigtes Glycerin 130 ccm. Die Mischung mufs 5—6 Wochen in einem mit durchlöchertem Papier bedeckten Gefäfse stehen, bis der Alkohol verdunstet ist, dann filtriert man. Beim Gebrauch wird mit 1—2 Teilen reinen Glycerins verdünnt. Zur Entwässerung der Schnitte wird eosinhaltiger Alkohol genommen.

43) **Eosin-Hämatein.** Früher nahm ich zu dieser Doppelfärbung Hämatoxylin, jetzt nehme ich nur noch Hämatein. Ich verfahre dabei stets folgendermafsen. Die Schnitte werden 24 Stunden lang in konzentrierter wässriger Eosinlösung gefärbt, darauf werden sie sorgfältig in destilliertem Wasser ausgewaschen und kommen nun für wenige Minuten ($^1/_2$—2) entweder in Hämalaun oder in meine Hämateinlösung (cf. dies Kapitel Nr. 18 und 19). Je länger sie in der Hämateinlösung bleiben, desto mehr wird das Eosin zurückgedrängt. Dann wird gut in Wasser ausgewaschen und so lange in 96 % Alkohol extrahiert, bis kein Eosin mehr ausgeht. Will man durchfärben, so bringt man die Stücke in Eosin und färbt in Hämatein die Schnitte nach; bei Schnittfärbung verfährt man nach den obigen Regeln. Mit dieser Methode habe ich nach fast jeder Fixierung, ausgenommen reine Chromsäure und Flemming'sche Lösung, ganz vorzügliche Präparate bekommen. Färbt man dagegen erst mit Hämatein und dann mit Eosin, so sind die Resultate sehr viel schlechter, denn nunmehr geht das Eosin nicht mehr gut an die Gewebsteile heran und wird, wenn man reinen Alkohol nimmt, fast ganz ausgezogen. Färbt *Muskeln, Zellplasma, Eiweissdrüsen* intensiv rot, *Kerne* dunkelblau, *Mucin* veilchenblau, *Bindegewebe* graublau.

Orange G-Hämatein. Wie bei der vorigen Doppelfärbung so nehme ich auch bei dieser *von mir eingeführten* Kombination statt Hämatoxylin Hämatein. *Nur für Schnittfärbung geeignet*, da das Orange, wenn man durchfärben will, von dem Alkohol krystallinisch niedergeschlagen wird. Vorherige Fixierung in Pikrinsalpetersäure, Pikrinschwefelsäure, Sublimat oder Alkohol. Die Schnitte kommen für 24 Stunden in eine gesättigte wässrige Lösung von Orange G, dann *ohne Auswaschen* für $^1/_2$ Minute in meine Hämateinlösung (dies Kapitel No. 19), werden dann gut in destilliertem Wasser ausgewaschen und in 96 % Alkohol übertragen. Zu langes Verweilen im Hämatein verdrängt das Orange. *Muskeln*, glatte und quergestreifte, hellgelb; *Drüsenplasma von Eiweissdrüsen, Zellsubstanz* und *Knochengrundsubstanz* orangefarben; *Bindesubstanz* leicht graublau; *Mucindrüsen, mucinhaltige Becherzellen* und *Knorpelgrundsubstanz* veilchenblau; *Kerne* dunkelblau. Die Färbung ist viel zarter und distinkter als nach Eosin-Hämatein und für das Auge bedeutend sympathischer. Bei rein epithelialen Ge-

bilden steht sie allerdings der vorigen Doppeltärbung nach. *Ich kann diese Kombination als ganz vorzüglich empfehlen.*

Zwei Aniline.

45) **Eosin-Methylgrün** *nach* List. Man macht sich zwei Lösungen. Lösung 1 besteht aus 0,5 gr. Eosin, 100 ccm. Aqua destillata und 300 ccm. Alkohol absolutus. Lösung 2 enthält Methylgrün 0,5 gr., destilliertes Wasser 100 ccm. Man färbt 5 Minuten in Lösung 1, wäscht aus und färbt 5 Minuten in Lösung 2; dann wird ausgewaschen und in Alkohol so lange ausgezogen, bis die Eosinfarbe wieder erscheint. Ich habe über diese Kombination keine Erfahrungen.

46) **Eosin-Methylblau** *nach* Mann. Es werden 35 ccm. 1 % Methylblaulösung OO in Wasser, 45 ccm. 1 % wässriger Eosinlösung und 100 ccm. Aqua destillata gemischt. Schnitte von Präparaten, die in Sublimat oder Mann'scher Flüssigkeit (cf. Kap. III Nr. 45) fixiert waren, kommen für 24 Stunden in die Farbflotte, dann werden sie in Wasser abgespült, in Alkohol entwässert und nun in folgende Lösung übertragen: 1 % Natronlauge (in absolutem Alkohol) 4 Tropfen, Alkohol absolutus 50 ccm. In diesem Gemisch werden die Schnitte rötlich, sie werden herausgenommen, mit einigen Tropfen absoluten Alkohols abgespült, dann in Wasser gebracht, in welchem blaue Wolken ausgehen und nach 2 Minuten in Wasser überführt, welches mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert ist. Hierin wird die Natronlauge neutralisiert und die Schnitte werden blauer. Dann wird entwässert und montiert. *Zellen blau mit Ausnahme der Nucleolen, alle Blutgefässe rot.*

47) **Safranin-Gentiana** *nach* Flemming. Zum Studium von *Zellteilung* und *Spermatogenese.* Man färbt die Schnitte (Fixierung in Flemming'scher Lösung) 2 Tage in gewöhnlichem Safranin, wäscht dann in Wasser so lange aus, bis sich wenig oder nichts mehr löst, und färbt mit „undurchsichtiger" wässriger Gentianalösung einige Stunden bis 1 Tag. Dann kann man entweder in ganz schwachsaurem Alkohol ausziehen oder wendet *das* Gram'sche *Verfahren* an, wäscht in Wasser aus und bringt in Alkohol ein, aus dem die Präparate entnommen werden, wenn keine Farbstoffwolken mehr ausgehen.

48) **Safranin-Gentiana** *nach* Hermann. Schnitte von Material, das in Hermann'scher Lösung fixiert war, kommen zunächst in Safranin. Man nimmt entweder Babes'sches Safranin (cf. dies Kap. Nr. 24) oder stellt sich folgende Lösung her: Safranin 1 gr., Alkohol absolutus 10 ccm., Anilinwasser nach Ehrlich 90 ccm. Darin bleiben die Schnitte 24—48 Stunden, werden dann in Wasser abgespült, in salzsaurem Alkohol ausgezogen, in neutralen absoluten Alkohol übertragen. Aus letzterem kommen sie, bevor sie völlig entfärbt sind, für 3—5 Minuten in wässrige Gentianalösung, werden flüchtig abgespült und dem Gram'schen *Verfahren* 1—3 Stunden unterworfen, bis sie schwarz sind. Dann kommen sie in absoluten Alkohol, Xylol, Balsam. Fertige Schnitte haben einen violetten Ton mit einem leichten Stich ins Bräunliche. Zum Studium von *Zellteilungen* und *Spermatogenese.*

49) **Safranin-Lichtgrün** *nach* Benda. Man färbt die Schnitte — Fixierung in Flemming'scher Lösung — in Anilinsafranin (nach Babes,

(cf. Nr. 24 dieses Kapitels) 24 Stunden lang und bringt sie dann für $^1/_4$—$^1/_2$ Minute in eine Lösung von Lichtgrün (1 gr. in 100 ccm. Alkohol 96 %). Die Differenzierung mufs sorgfältig abgepafst werden, sonst verdrängt das Lichtgrün das Safranin vollständig. *Zellsubstanzen* grün, *Kerne* rot.

Dreifachfärbungen.

50) **Pikrokarmin-Hämatoxylin,** *nach* Flemming. Für *Hautschnitte* zu verwenden. Dieselben kommen bis zu 24 Stunden in eine mittelstarke Pikrokarminlösung, dann für einige Zeit in Delafield'sches Hämatoxylin; Auswaschen in Wasser, Alkohol etc. *Bindegewebe* rosa; *Muskeln* gelbrötlich, ebenso die *Zellkörper; Zellkerne* dunkel purpurn bis violett; *hornige Substanz des Haares* pikringelb; *innere Wurzelscheide* brillant lichtblau; *Stratum lucidum* grün.

51) **Orange G-Säurefuchsin-Methylgrün; Ehrlich-Biondi'sches Gemisch.** Ehrlich hat *zuerst* die Mischung der drei Farbstoffe empfohlen, nur wendete er deren Lösungen getrennt an, Biondi verbesserte die Methode, indem er die Lösungen vor dem Gebrauche vermischte, R. Heidenhain hat das Gemisch zuerst in einer Abhandlung empfohlen. Es ist daher eine Ungerechtigkeit, wenn neuere Autoren das Gemisch Biondi-Heidenhain'sches nennen; Ehrlich's Name hat mehr Anspruch auf Erwähnung, als die der beiden anderen Autoren; es wäre daher richtig bei der oben angeführten Bezeichnung zu bleiben. Man mischt 100 ccm. wässriger Lösung von Orange G, 20 ccm. wässriger gesättigter Lösung von Säurefuchsin und 50 ccm. gesättigter wässriger Methylgrünlösung. Letztere wird unter stetem Umrühren in die Mischung der ersteren beiden eingetragen. Zum Gebrauche wird ein Quantum der Lösung mit dem 60—100fachen an destilliertem Wasser verdünnt. *Nur für Schnittfärbung.* Die Färbungsdauer ist 24 Stunden. Für Sublimat — weniger gut für Pikrinsalpetersäurepräparate zu verwenden. Nach dem Färben wird flüchtig in Wasser abgewaschen und in Alkohol von 96 % extrahiert, bis keine Farbstoffwolken mehr entweichen. *Das Gemisch ist in Lösung oder Substanz von* Grübler *zu beziehen.*

52) **Ehrlich's Triacidgemisch.** In eine Literflasche bringt man 100 ccm. Aqua destillata, 135 ccm. gesättigter wässriger Lösung von Orange G und 65 ccm. gesättigter wässriger Lösung von Säurefuchsin. Der Masscylinder, in welchem man die Farblösungen abgemessen hat, wird mit 100 ccm. Aqua destillata ausgespült, die dem vorigen Gemisch in der Flasche beizufügen sind. Dann bringt man 125 ccm. gesättigter Äthylgrünlösung allmählich unter häufigem Schütteln der Flasche ein, gibt 100 ccm. Aqua destillata, mit welchem der Mafscylinder ausgespült wurde, nach und fügt zu dem Gemisch in der Flasche 100 ccm. 96 % Alkohol und 125 ccm. Glycerin. *Das Triacidgemisch ist fertig bei* Grübler *zu kaufen.*

53) **Oppel's Dreifarbengemisch.** Man mischt 120 ccm. 1 % wässriger Methylgrünlösung, 2 ccm. 1 % wässriger Eosinlösung, 40 ccm. 1 % wässriger Säurefuchsinlösung und 40 ccm. Alkohol absolutus. In dem Gemisch bleiben die Schnitte 15 Minuten, dann kommen sie für 30 Sekunden in folgende Pikrinsäurelösung: gesättigte wässrige

Pikrinsäurelösung 80 ccm. + 20 ccm. Alkohol absolutus. Darauf in absoluten Alkohol, dann montieren.

54) **Flemming's Orangeverfahren.** Schnitte von Material, das in Flemming'scher oder Hermann'scher Lösung fixiert war, kommen in wenige ccm. gewöhnlicher Safraninlösung für 2—3 Tage, dann Abwaschen in destilliertem Wasser und Ausziehen in salzsaurem absolutem Alkohol (1 : 1000), bis nur noch wenig Farbe ausgeht. Darauf wiederum kurzes Waschen in Aqua destillata und Färben für 1—3 Stunden in einem kleinen Quantum wässriger Gentianaviolettlösung, dann kurzes Waschen und Einbringen in konzentrierte Lösung von Orange G. Hier gehen Farbstoffwolken aus, nach wenigen Minuten in neutralen absoluten Alkohol. Während des Ausgehens der Farbstoffwolken Wechsel des Alkohols, dann nach kurzer Zeit montieren. Zum *Studium der Zellteilungen. Spindelfäden* graubraun, grau oder violettgrau, ebenso *Centralkörperchen; Attraktionssphären* ohne besondere Färbung aber dunkler als sonst. Das Verfahren leistet ausgezeichnetes, hat aber den Nachteil, dafs sich häufig das Orange in krystallinischer Form infolge des direkten Einbringens in den Alkohol im Schnitte niederschlägt.

β) Die adjektiven Färbungen.

I. Die Hämatoxylinlacke.

55) **R. Heidenhain'sche Hämatoxylinfärbung.** Diese Methode war diejenige, welche die Aera der adjektiven Färbungen eröffnete. Sie unterscheidet sich von den übrigen Methoden und der Art der adjektiven Färbung überhaupt dadurch, dafs hier erst das Material gefärbt und dann durch Anwenden der Beize in ihm der Farblack erzeugt wird. Die Methode wird heute nur noch wenig gebraucht, doch soll sie hier im historischen Interesse ihren Platz finden.

Man stellt sich eine $^1/_2$ % wässrige Lösung von Hämatoxylin dar — *zum adjektiven Färben darf man die Alaunhämatoxyline nicht wählen* — oder man kann auch eine entsprechend schwächere Lösung von Hämatein nehmen. Die Lösung braucht keine Zeit zum Ausreifen und kann daher frisch verwandt werden. In ein nicht zu geringes Quantum dieser Lösung kommen die in verschiedenster Weise fixierten und in Alkohol nachgehärteten Objekte auf 24—48 Stunden, also *Stückfärbung*. Dann werden sie direkt in ein ebenso grofses Quantum einer $^1/_3$ % wässrigen Lösung des einfach chromsauren Kali, also des neutralen gelben Salzes, gebracht. Alsbald nach der Überführung beginnen aus dem Präparate dunkelblauschwarze Farbstoffwolken zu entweichen, die allmählich eine solche Intensität erlangen, dafs man das Präparat nicht mehr sehen kann. Man mufs daher das chromsaure Kali mehrmals wechseln. In demselben verbleiben die Objekte ebenfalls 24—48 Stunden, mindestens aber so lange, bis keine Farbstoffwolken mehr entweichen. Dann werden sie sehr sorgsam ausgewaschen, langsam erhärtet, entwässert und in Paraffin eingeschmolzen So behandelte Objekte sind *dunkelschwarz*, die von ihnen anzufertigenden Schnitte müssen daher äusserst fein sein, mehr als 5 μ dürfen sie keineswegs besitzen, weil sonst nichts zu sehen ist. Das Bild, das ein von einem derartigen Präparate gemachter Schnitt darbietet, gleicht

nach R. Heidenhain's Ausdruck einem „gut ausgeführten Holzschnitte". In dünnen Schnitten hat man ein bläulichschwarzes, gleichmäfsiges Kolorit, das sich in feinster Nüance an den verschiedenen Gewebselementen abstuft; die *Kerne* sind hell, ihre Strukturen sind deutlich zu erkennen. Bei *drüsigen Organen wirbelloser Tiere* erhält man ausgezeichnete Bilder. Nach Flemming kann man solche Schnitte in Alaunkarmin mit Vorteil nachfärfen.

56) **Benda'sche ältere Eisenhämatoxylinfärbung.** Die *Schnitte* kommen zunächst auf Minuten bis Stunden in eine konzentrierte Lösung von schwefelsaurem Eisenammonium. (Man muss selbstverständlich das Oxydsalz oder den *Eisenalaun* nehmen, da allein die Lösungen der Oxyde haltbar sind; das Oxydulsalz oder Mohr'sche *Salz* darf nicht verwendet werden. Eisenalaun hat violette Krystalle, Mohr'sches Salz ist grün). Nach dem Beizen werden die Schnitte sorgfältig ausgewaschen und in eine 1 % wässrige Hämatoxylinlösung übergeführt. Hierin bleiben sie, bis sie schwarz sind, was etwa nach 10 Minuten der Fall ist. Danach kommen sie auf etwa 5 Minuten in eine Chromsäurelösung von 1 : 2000, in welcher sie differenziert werden. *Die Hämatoxylinlacke sind nämlich sehr wenig säure- und alkalifest*, durch Anwendung geeigneter Säuren oder Alkalien kann man die diffuse Färbung in eine ganz distinkte verwandeln. Für *alle Organe nach beliebiger Fixierung* verwendbar. *Nur Schnittfärbung.*

56 a) M. Heidenhain *hat diese Methode in folgender Weise modifiziert.* Er bringt die Schnitte in eine 1,5—4 % Eisenalaunlösung ½ bis höchstens 2—3 Stunden, spült kurz in Wasser ab und bringt dann für ½—12 Stunden in eine wässrige Lösung von Hämatoxylin. Dadurch werden die Schnitte schwarz bis zur Undurchsichtigkeit. Darauf wird in Leitungswasser kurz abgespült und in der Beizflüssigkeit differenziert. (Heidenhain benutzt hier die in der industriellen Färbetechnik längst bekannte Thatsache, dafs durch Beizen hergestellte Farblacke in einem Überschufs der Beize sich wieder lösen.) Die Differenzierung ist genau zu beaufsichtigen. Die *Färbung* ist schwarz, schwarzblau oder blau von mittlerer Intensität; bei kurzem Beizen Überwiegen des blauen Farbentons. Besonders für *Centrosomen* geeignet.

57) **Benda's neuere Eisenhämatoxylinmethode.** Der Eisenalaun hat den *grossen Nachteil*, dafs er amorphe Niederschläge im Präparate bildet. Um dies zu vermeiden, hat Benda seine ältere Eisenmethode aufgegeben und verwendet die folgende, *die sehr zu empfehlen ist.* Die Fixierung des Materials ist gleichgiltig. Die Schnitte werden in dem Liquor ferri sulfurici oxydati der Pharmacopoea Germanica gebeizt, der entweder im gleichen Verhältnisse oder mit zwei Volumen Aqua destillata verdünnt wird. In der Beize bleiben die Schnitte 24 Stunden, dann werden sie sorgfältig zunächst in destilliertem, darauf in gewöhnlichem Wasser gewaschen und in eine 1 % wässrige Hämatoxylinlösung eingebracht, bis sie schwarz sind. Nach kurzem Waschen, das auch unterbleiben kann, werden sie in 30 % Essigsäure differenziert. Wählt man eine dünnere Säure, so braucht die Differenzierung nicht überwacht zu werden. *Für alle Organe geeignet*, gibt auch eine sehr gute *Axencylinderfärbung.*

58) **Benda'sche Kupferhämatoxylinfärbung.** Die Schnitte von

Material, das in FLEMMING'scher Lösung fixiert war, kommen in eine konzentrierte wässrige Lösung von neutralem Cuprum aceticum und bleiben 24 Stunden in derselben im Brütofen bei Brüttemperatur oder 48 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach gutem Auswaschen werden sie in eine 1 % wässrige Hämatoxylinlösung übergeführt, verweilen darin, bis sie schwarz sind, und kommen dann zur Differenzierung in eine Salzsäurelösung von 1 : 300—500 Wasser. Hierin bleiben sie, bis sie gelb sind, welcher Zeitpunkt sehr genau abzupassen ist. Nachher werden sie zur Neutralisierung der Säure von neuen in die Kupferlösung übertragen, bis sie bläulich sind und sorgfältig gewaschen. *Farbenton* wie bei Nr. 55. Zum *Studium der Spermatogenese* sehr geeignet.

59) **WEIGERT'sche Hämatoxylinfärbung.** Diese Methode ist eine der wertvollsten Errungenschaften der letzten Zeit *zur Untersuchung des Zentralnervensystems der Wirbeltiere.* Das ganze vorher in Celloidin oder Photoxylin eingebettete und aufgeklebte Gehirn (bez. ein Stück eines Rückenmarks) kommt aus dem Alkohol auf 24—72 Stunden in eine konzentrierte wässrige Lösung von Cuprum aceticum. Das Gefäfs, welches Präparat und Flüssigkeit enthält, wird während der genannten Zeit der Temperatur des Brütofens unterworfen; geglückt ist die Kupferung, wenn die Einbettungsmasse einen bläulichgrünen Farbenton hat. Nach der Kupferung wird sorgfältig in destilliertem Wasser ausgewaschen und dann in 70 % oder 80 % Alkohol überführt. Die Schnitte von *Gehirn und Rückenmark, und nur für diese Organe ist die Methode verwertbar*, werden 24 Stunden in einer *Lithionhämathoxylinlösung* gefärbt, die folgendermafsen hergestellt wurde: Hämatoxylin 1 gr., Aq. destillata 90 ccm., Alkohol absolutus 10 ccm. und kalt gesättigte wässrige Lösung von Lithion carbonicum 1 ccm. Man löst das Hämatoxylin in Wasser durch Erwärmen und fügt nach dem Erkalten den Alkohol hinzu. Das Lithion carbonicum wird erst unmittelbar vor dem Gebrauche beigemischt, weil sonst die Lösung bei längerem Stehen verderben würde; sie würde braun statt rötlich violett sein. In der Hämatoxylinlösung bildet sich der Hämatoxylinkupferlack; die Schnitte werden dabei aber so brüchig, dafs es sich empfiehlt, entweder die WEIGERT'sche Kollodium- oder die OBREGIA'sche Photoxylinlappenmethode anzuwenden (cf. Kap. VI No. 9 und 10). Nach 24stündigem Verweilen in der Farbflotte werden die Schnitte in gewöhnlichem Wasser abgewaschen und dann in folgende *Entfärbungsflüssigkeit* gebracht: Ferridcyankalium (rotes Blutlaugensalz) 2,0 gr., Borax 2,5 gr., Aqua destillata 100 ccm. In dieser Lösung tritt die Entfärbung sehr schnell, in etwa 15 Minuten, ein. *Es ist aber besser, langsam zu entfärben*, und man kann zu diesem Zwecke die Entfärbungsflüssigkeit mit dem gleichen, doppelten oder dreifachen Volumen destillierten Wassers verdünnen und so die volle Entfärbung bis zu 24 Stunden verzögern. Im allgemeinen ist zu bemerken, dafs die Entfärbungsflüssigkeit im Anfange sehr schnell wirkt, dafs aber die letzten Reste des Farbstoffes vor vollendeter Differenzierung sehr langsam entweichen. Nach beendeter Einwirkung wird sorgsam in Wasser ausgewaschen und dann montiert. *Der Endeffekt ist der, dass nur das Mark der markhaltigen Nervenfasern sich gefärbt hat*, und zwar bei gelungener Färbung dunkelblau mit einem Stich in's Grünliche; alles andere ist braun oder gelbbraun. Zwar sind die Nervenzellen noch zu erkennen, indessen nur als strohgelbe oder braune Gebilde; bei Anwendung schwacher Linsensysteme aber, wie sie beim

Studium des Faserverlaufs in Gehirn und Rückenmark allein gebraucht werden, treten alle Elemente gegen die Nervenfasern zurück und deren Verteilung im Gehirn und Rückenmark ist daher der Beobachtung in einer Weise zugänglich gemacht, wie bei keiner anderen Methode. Die Weigert'sche Färbung hat daher alle früher üblichen Behandlungen, namentlich die Vergoldungen, mit Recht vollständig verdrängt.

Um, wenn es notwendig sein sollte, noch eine Kernfärbung zu erhalten, kann man die in Ferridcyankalium entfärbten Schnitte in Alaunkarmin nachfärben.

60) **Pal's Hämatoxylinfärbung.** Als eine Modifikation der Weigert'schen Färbung ist die Pal'sche anzusehen, zu deren Ausführung, da dieselbe mit Sekunden rechnet, es notwendig ist, die einzelnen Schnitte nach der Kollodium- oder Photoxylinlappenmethode zu behandeln (cf. Kap. VI Nr. 9 und 10). Die Schnitte vom *Zentralnervensystem* kommen in eine $^3/_4$ % heifs bereitete *wässrige Hämatoxylinlösung*, der nach dem Erkalten *Alkohol*, etwa in dem Verhältnis wie es Weigert angegeben, zugesetzt wird; auf je 100 ccm. werden dann noch 2 ccm. *kalt gesättigter wässriger Lithion carbonicum-Lösung* zugefügt. Da hier *keine* Vorkupferung stattfindet, so mufs sich ein Chromlack des Hämatoxylins bilden, indem das von der Fixierung in Müller'scher Lösung in den Organteilen zurückgebliebene Chrom sich mit dem Hämatoxylin verbindet. Nach beendeter Färbung, also schon nach 5—6 Stunden, wird in Wasser, dem etwas Lithion carbonicum zugesetzt ist, abgewaschen. Darauf kommen die Schnitte für 15—20 Sekunden in eine $^1/_4$ % Lösung von Kali hypermanganicum und dann bis zur vollständigen Entfärbung des Zwischengewebes *direkt* in folgende *Entfärbungsflüssigkeit:* 1 gr. Acidum oxalicum, 1 gr. Kali sulfurosum gelöst in 200 ccm. Aqua destillata. Das Wirksame ist in dieser Lösung die durch Verbindung der Oxalsäure mit dem Kali frei werdende schweflige Säure. Man kann zur Kerntinktion in Alaunkarmin nachfärben, doch dürfen die Schnitte nicht zu lange in dieser Farblösung bleiben, weil sonst das Hämatoxylin verdrängt wird. Die *markhaltigen Nervenfasern* heben sich scharf von den Zellen und den rot gefärbten (in Alaunkarmin) Kernen ab.

61) **Pal's Hämatoxylin mit Safranin,** *nach* Hermann. Material, das in Hermann'scher Lösung fixiert war (cf. Kap. III Nr. 50), wird in Pal'schem Hämatoxylin (1 gr. Hämatoxylin, 70 ccm. Alkohol absolutus, Aqua destillata 30 ccm.) *durchgefärbt.* Das Material bleibt in der Lösung 12—18 Stunden im *Dunkeln*, kommt dann, ebenfalls *im Dunkeln*, in Alkohol von 70 %, der bis zu absolutem Alkohol gesteigert wird, dann wird eingebettet. Die Schnitte werden mit hellrosafarbener Kalihypermanganicum-Lösung behandelt, bis sie selbst hellrosa sind, dann flüchtig in Wasser abgespült, in die 5—10fach verdünnte Pal'sche Entfärbungsflüssigkeit gebracht und endlich 3—5 Minuten, *nicht länger*, in Safranin nachgefärbt.

II. Die Anilinlacke.

Bisher war es allein das Hämatoxylin, welches in adjektiver Form in der Histiologie Verwendung gefunden; ich empfehle hier eine Gebrauchsweise der Aniline, welche der in der Baumwollenfärberei üblichen nachgebildet ist und mich in manchen Punkten weiter geführt

hat, als die gewöhnliche substantive Färbung. Von den vielen Methoden, die ich geprüft, kann ich z. Z. nur die folgende als für histiologische Zwecke brauchbar anführen. Damit aber soll nicht gesagt sein, dafs dadurch die Anwendbarkeit der adjektiven Färbung mit Anilinen begrenzt sei; ich hoffe vielmehr, dafs die neue Methodik auch von anderen Forschern weiter ausgebildet werde und sich uns somit ein neuer Weg der Färbung eröffnen möge, der sicher zu neuen und wertvollen Ergebnissen führen wird.

62) **Tannin-Brechweinstein-Fuchsin oder Safranin.** Schnitte, die von einem in Flemming'scher Lösung oder in reiner Chromsäure oder in Chromessigsäure fixierten Materiale stammen, werden in eine 20 % Tanninlösung gebracht und bei Zimmertemperatur darin gelassen. Es ist *dringend abzuraten,* die Tannisierung in der Wärme vorzunehmen, da das nur Nachteile hat, denn das Tannin geht in der Wärme fast gar nicht an die Organteile heran. Man löst das Tannin in der Kälte; 24 Stunden nach Einbringen des käuflichen pulvrigen Tannins in destilliertes Wasser ist alles gelöst und die Lösung hat eine dunkelbraune Farbe; sie hält sich ziemlich lange. Aus dem Tannin kommen die Schnitte nach gutem Abwaschen in destilliertem Wasser in eine 1—2½ % Lösung von Brechweinstein. Hierin läfst man sie entweder 24 Stunden bei Zimmertemperatur oder 2—4 Stunden bei circa 40° C., indem man sie für letzteren Fall auf die Decke des Wärmeschrankes stellt. Dann werden sie sehr gut in destilliertem Wasser abgewaschen und in die Farbflotte eingebracht. Man hält sich gesättigte alkoholische Fuchsin- oder Safraninlösung vorrätig und verdünnt das zum Gebrauche nötige Quantum mit der gleichen Menge destillierten Wassers. In der Farbflotte bleiben die (natürlich aufgeklebten) Schnitte 24 Stunden, dann kommen sie in destilliertes Wasser, in welchem sie flüchtig abgespült werden, und endlich in Alkohol von 96 % oder auch direkt in letzteren, in welchem sie so lange bleiben, bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. Ist die Färbung, wie man von vorneherein gesehen hat, zu intensiv, wird der überschüssige Farbstoff beim Auswaschen in Wasser bez. Alkohol nicht entfernt, so kann man in eine 2½ % Tanninlösung einbringen. Hier wird der überschüssige Farbstoff gelöst. Man läfst in dem *Differenziertannin* 2—24 Stunden, wäscht gut aus, entwässert und montiert.

In der gleichen Weise verwendbar, also nach *Vorbeizung mit Tannin-Brechweinstein*, sind **Methylviolett (bez. Gentianaviolett) und Smaragdgrün.** Man hält sich konzentrierte wässrige Lösungen vorrätig, die man zum Gebrauche mit dem doppelten Quantum destillierten Wassers verdünnt.

Der Effekt der Färbung ist ein ganz merkwürdiger. Safranin, Fuchsin, Methylviolett und Smaragdgrün sind bei substantiver Verwendung reine oder fast reine Kernfarbstoffe, *nach adjektiver Verwendung tritt eine Umkehrung des Verhaltens ein*: ich nenne das *Inversion der Färbung.* Beide Farbstoffe lassen nämlich die chromatischen Teile des Kernes ganz unberührt und färben nur die Zellsubstanz und das Liningerüst, *sie sind also Plasmafarbstoffe geworden.* An Salamanderhoden, an welchen ich bisher diese Methoden prüfte, konnte ich dadurch *Centrosoma und Attraktionssphäre* der ruhenden Zelle mit einer Deutlichkeit darstellen, wie sie bei keiner anderen Methode erreicht wird. An *sich teilenden Kernen* sind die *Spindelfasern* gefärbt und die Chromosomen nicht;

letztere haben vielmehr eine braune Farbe, die auf die Chromsäure- oder Tanninwirkung zu beziehen ist.

Am besten tritt diese *Inversion der Färbung* an Präparaten aus Flemming'scher Lösung auf, es scheint — etwas absolut Genaues kann ich nicht sagen — dafs eine starke Chromsäure bei der Fixierung der Inversion günstig ist. An den Randpartieen der Präparate aus Flemming'scher Lösung ist die Färbung eine mehr diffuse; zwar die Struktur der Zellsubstanz tritt klar hervor, aber die Kerne, deren Gerüst völlig zertrümmert ist, sind ebenfalls diffus gefärbt.

Das Eiweifs, mit welchem die Schnitte aufgeklebt sind, färbt sich stark mit, doch erwächst daraus für die Untersuchung kein Nachteil. Sehr wichtig ist, dafs die Gläser (Objektträger, Deckgläser) gut gereinigt sind, denn es färben sich auch die Verunreinigungen mit.

Ich kann zum *Studium der ruhenden und sich teilenden Zelle* die adjektive Verwendung von Safranin, Fuchsin, Methylviolett und Smaragdgrün nur *auf das angelegentlichste empfehlen.* An Präparaten, die mit einem anderen Fixierungsmittel als die drei angeführten behandelt wurden, erhält man diffuse Färbungen.

γ) Die vitale Färbung.

Ehrlich hat diese Methode der Färbung eingeführt und als den dazu geeignetsten Farbstoff das *Methylenblau* empfohlen; die Methode heifst daher auch *vitale Methylenblaumethode.*

Man löst 1 gr. Farbstoff in 300—400 ccm. einer 0,5 % Kochsalzlösung und injiziert in die Vene eines Tieres. Die injizierten Partieen, die sich durch eine blaue Färbung kennzeichnen, setzt man einige Minuten bis mehrere Stunden der Luft aus und untersucht dann entweder die frischen Objekte, nachdem man sie in geeigneter Weise komprimiert hat, oder aber man fixiert die Farbe.

Zur *Fixierung des Methylenblau* ist das Hoyer'sche *Pikrokarmin* (cf. dies Kapitel Nr. 36) oder das *pikrinsaure Ammoniak* geeignet. Die fixierende Wirkung des Hoyer'schen Pikrokarmins ist auf seinen Gehalt an pikrinsaurem Ammoniak zurückzuführen.

Nach S. Mayer macht man sich eine kalt gesättigte wässrige Lösung von pikrinsaurem Ammoniak und verdünnt sie zum Gebrauche mit dem gleichen Volumen Glycerin. A. S. Dogiel dagegen widerrät dringend den Zusatz von Glycerin zur Fixierung, sondern nimmt entweder nur eine wässrige Lösung von pikrinsaurem Ammoniak oder auch folgendes Gemisch: 100 ccm. gesättigter wässriger Ammoniumpikratlösung und 1—2 ccm. 1 % Osmiumsäurelösung, in welchem die gefärbten Teile 18—24 Stunden verbleiben. Man hebt stets definitiv in Glycerin auf, dem Ammoniumpikratlösung beigemischt ist. In dem Fixierungsgemisch verändert sich die blaue Farbe, es tritt ein rötlichbrauner, rotbrauner, blauschwarzer oder blaugrüner Farbenton auf.

Man kann übrigens auch eine viel stärkere *Methylenblaulösung* (bis zu 4 %) injizieren, und kann endlich, *da es sich um eine Färbung der Organe im Momente ihres Absterbens handelt,* die dem eben getödteten Tiere entnommenen Teile in eine starke oder schwache Methylenblaulösung einbringen. Die Konzentration kann bis $^1/_{10}$ % heruntergesetzt werden.

Die direkt, nicht nach Injektion, in die Farblösung gebrachten

Teile verbleiben in derselben 10 Minuten bis 2 Stunden, dann werden sie in $^1/_2$ % Kochsalzlösung abgewaschen und in die Fixierungsflüssigkeit gebracht, aus der sie nach mehreren bis 24 Stunden entfernt werden. Sie werden nun entweder zerzupft, was in ammoniumpikrathaltigem Glycerin zu geschehen hat, oder nach Einklemmung in Hollundermark geschnitten oder in anderer geeigneter Weise ausgebreitet und in Glycerin mit Ammoniumpikrat aufgehoben. Kleine Seetiere (Quallen) werden am besten in toto in die Farbflotte gebracht, die zu diesem Zwecke mit Seewasser hergestellt wird.

Die Wirkung des Farbstoffes ist sowohl nach der Injektion wie nach direktem Einbringen *die folgende: Es färben sich nur die Achsencylinder der Nerven der Hirnrinde, der sensiblen Nerven* und *der motorischen Nerven der glatten Muskeln,* während die Endigungen der motorischen willkürlichen Nerven sich nicht färben. Jene reagieren nach Ehrlich's Auffassung alkalisch, diese sauer. Die Zellen und Gewebe der übrigen Organe färben sich gar nicht.

Anhang zu Kapitel VII.

Tabelle der Synonyma der in der Histiologie gebräuchlichsten Anilinfarben.

Vielfach werden Anilinfarbstoffe von verschiedenen Namen empfohlen, die, wenn man genauer zusieht, nur Synonyma von anderen gleichwertigen sind. Die einzelnen Fabrikanten bezeichnen die von ihnen hergestellten Nüancen mit speziellen Namen; dies ist für die industrielle Praxis von Wichtigkeit, da die verschiedenen Nüancierungen sich einer verschiedenen Beliebtheit beim kaufenden Publikum erfreuen. Diese Nüancen sind aber bedeutungslos für den Histiologen, da er durch dieselben keine verschiedenwertigen und verschiedenartigen Resultate erhält. Um nun in dem Wirrwarr der Namen, der jetzt schon herrscht und leicht noch gröfser werden kann, einen Anhalt zu haben, um bei einer neuen Empfehlung von vorneherein zu wissen, ob man es nur mit einem Synonym oder mit einem wirklich neuen Farbstoffe, neu wenigstens für die histiologische Technik, zu thun hat, gebe ich die folgende Tabelle der Synonyma. Als Hauptnamen figurieren die Namen, die in der Farbenchemie ebenfalls Hauptnamen (nicht die Konstitutionsnamen) sind; diejenigen Synonyma, welche in der Histiologie anstatt der Hauptnamen gebraucht werden, sind durch besonderen Druck hervorgehoben; wo das nicht der Fall ist, ist der Hauptname im Gebrauch. Auf Vollständigkeit kann und soll die Tabelle keinen Anspruch machen, hoffentlich aber genügt sie dem vorhandenen Bedürfnis.

a. Rote Farben.

Congorot.

Eosin.
(Syn. wasserlösliches Eosin.)

Spriteosin.
(Syn. Erythrin, Primerose, Methyleosin, Aethyleosin.)

Safrosin.
(Syn. Eosin BN., Eosinscharlach.)

Erythrosin.
(Syn. Eosin F., Pyrosin, Primerose soluble.)

Fuchsin.
(Syn. Diamantfuchsin, Anilinrot, Rubin, Magenta.)

Fuchsin S.
(Syn. Rubin S., Säurefuchsin, Säurerubin.)

Naphthalinrot.
(Syn. Naphthalinrosa, Magdalarot.)

Safranin.
(Syn. Fuchsia, Giroflé, Rosalan.)

Orcein.

b. Gelbe Farben.

Dimethylanilinorange.
(Syn. Helianthin, Orange III, Methylorange, Tropaeolin D.)

Diphenylaminorange.
(Syn. Diphenylorange, Tropaeolin OO, Orange IV, Orange N, Orange GS, Neugelb, Säuregelb.)

α Naphtholorange.
(Syn. Orange I, Tropaeolin OOO Nr. 1.)

β Naphtholorange.
(Syn. Orange II, Tropaeolin OOO Nr. 2, Mandarin, Mandarin G extra, Chrysaurein, Goldorange.)

Orange G.
(Syn. Orange GG.)

Orange R.
(Syn. Orange T, Mandarin GR.)

Pikrinsäure.
(Syn. Trinitrophenol.)

c. Grüne Farben.

Brillantgrün.
(Syn. Neuvictoriagrün, Smaragdgrün, Aethylgrün, Solidgrün.)

Malachitgrün.
(Syn. Benzaldehydgrün, Bittermandelölgrün, Victoriagrün, Solidgrün, Neugrün, Krystallgrün.)

Methylgrün.

Säuregrün.
(Syn. Lichtgrün S., Helvetiagrün, Guineagrün.)

d. Blaue Farben.

Alkaliblau.
(Syn. Seidenblau, Baumwollblau, Wasserblau*), Chinablau, Opalblau.)

Anilinblau.
(Syn. Rosanilinblau, Spritblau**), Lyonerblau (Bleu de Lyon), Methylblau, Opalblau, Baseblau, Humboldtblau.)

Victoriablau B und 4 R.

Methylenblau.
(Syn. Aethylenblau, Phenylenblau.)

e. Violette Farben.

Hofmann's Violett.
(Syn. Methylviolett R bis 5 R, Dahlia, Primula, Jodviolett.)

Benzylviolett.
(Syn. Pariser Violett 6 B, Methylviolett 6 B, Methylviolett 6 B extra, Methylviolett B extra, Gentianaviolett B R, Violett 5 B, Violett 6 B, Pyoktanin.)

Krystallviolett.

f. Braune Farben.

Phenylenbraun.
(Syn. Vesuvin, Bismarckbraun, Manchesterbraun, Anilinbraun, Neutralbraun, Lederbraun, Goldbraun, Zimmtbraun, Englischbraun, Canelle.)

Kap. VIII. Die Metallimprägnation.

Allgemeine Bemerkungen.

In der histiologischen Technik werden zwei Salze edler Metalle verwendet, die das Eigentümliche haben, dafs sie die Gewebe *fixieren und färben*. Man nennt die Anwendungsweise der betreffenden Salze *die Metallimprägnation;* die Salze sind das *Goldchlorid* und das *salpetersaure Silber*. Statt des Goldchlorids kann man auch das *Goldchlorid-*

*) In Wasser löslich. — **) Nur in Spiritus löslich.

kalium und *Goldchloridnatrium* mit demselben Erfolge anwenden. Beiden Metallsalzen eigen ist die *Launenhaftigkeit ihrer Wirkung*; man ist nie seines Erfolges bei der Vergoldung oder Versilberung der tierischen Teile sicher; das eine Mal erhält man ganz ausgezeichnete Resultate, das andere Mal hat man am gleichen Objekte unter den gleichen Bedingungen und bei genauer Beobachtung aller Kautelen ein vollständiges Mifslingen der Imprägnation zu beklagen. Diese Thatsache mufs man sich stets gegenwärtig halten, will man kritisch die Methoden verwenden. Eine spezielle Eigenheit des Silbersalpeters ist seine grofse Neigung, Kunstprodukte zu machen; es entstehen Silberniederschläge und dadurch Andeutungen von Strukturen, die an der betreffenden Stelle unmöglich sich finden können. So hat Hans Rabl z. B. nachgewiesen, dafs durch Silbersalpeter auf Bindegewebe eine Querstreifung erzeugt wird, die bei kritikloser Betrachtung des mikroskopischen Bildes die Anwesenheit von quergestreiften Muskeln vortäuscht. Solche geschichtete oder auch amorphe Niederschläge können überall vorkommen und gerade bei der Verwendung der Silberlösung sollte man in der Verwertung der Resultate *sehr vorsichtig* sein.

Ich bringe die Metallsalze in einem besonderen Kapitel unter, eben weil sie die Eigenschaften haben, zu fixieren und zu färben; sie bei den Fixierungsmethoden zu lassen, wohin ich sie in der ersten Auflage gestellt hatte, schien mir nicht gerechtfertigt, ebensowenig aber konnten sie bei den wirklichen Farbstoffen einen Platz finden. Die Färbung, welche durch die Metallsalze hervorgebracht wird, beruht bei den einen Methoden auf einer Reduktion derselben zu Gold- oder Silberalbuminaten durch die Gewebssäfte und bei den anderen auf einer Reduktion durch Flüssigkeiten, mit welchen die Objekte künstlich durchtränkt waren.

a. Die Methoden der Vergoldung.

1) **Cohnheim'sche Vergoldung.** Cohnheim, welcher als der erste das Goldchlorid verwandte (J. Gerlach hat dann das Goldchloridkalium empfohlen) gibt folgende Vorschrift: In eine 1 % wässrige Lösung von Goldchlorid (bez. — kalium oder — natrium) kommen ganz frische Objekte für 15 Minuten bis ½ Stunde, bis eine strohgelbe Färbung eingetreten ist. Die Objekte sind im Dunkeln zu lassen. Man wäscht in Wasser ab und bringt dann in Wasser, dem einige Tropfen Essigsäure oder Ameisensäure zugesetzt sind, für mehrere Tage. Dabei kann das Objekt dem Lichte ausgesetzt sein. Ist die Reduktion vollendet, so mufs eine intensiv rote oder violette Färbung sich zeigen.

Zur Beförderung der Reduktion kann man sich auch der **Prichard'schen Mischung** bedienen; dieselbe hat folgende Zusammensetzung: Amylalkohol 1, Ameisensäure 1, Wasser 98.

Vergoldete Objekte *zerzupft* man entweder in Glycerin oder *härtet sie*, nachdem man sie nach der Reduktion gut ausgewaschen hat, in Alkohol von steigender Konzentration. Zum Herausnehmen der Objekte aus dem Gold darf man *keine Metallinstrumente* verwenden, da dieselben leiden und die Goldlösung verdorben wird.

2) **Hénocque'sche Goldmethode.** Zur schnelleren Reduktion bringt Hénocque mit Gold wie bei der Cohnheim'schen Methode behandelte und ausgewaschene Objekte in ein mit Glasstopfen zu ver-

schliefsendes Fläschchen, das eine konzentrierte Lösung von Weinsteinsäure enthält. Dieses Gefäfs wird während 15—20 Minuten der Temperatur des beinahe siedenden Wassers ausgesetzt. Die Reduktion ist in der That erfolgt, doch sind die Resultate, bei zarten Objekten wenigstens, nicht sehr rühmenswert.

3) **Löwitt'sche Goldmethode.** Dieselbe ist zur *Vergoldung von Muskeln* vielfach gerühmt worden. Die Prozedur ist folgende: In eine Lösung von 1 Teil Ameisensäure und 2 Teilen destillierten Wassers kommen kleine Stücke des Objektes für 1 Minute. Darauf werden sie in eine kleine Quantität einer 1 % Goldchloridlösung übertragen, bis sie gelb werden, was 5—10 Minuten erfordert. Hierauf wird erst in verdünnte Ameisensäure übergeführt, dann in konzentrierter Ameisensäure für 1 Tag im Dunkeln stehen gelassen. Untersuchung in Wasser oder verdünntem Glycerin.

4) **Ranvier'sche Goldmethode.** Ranvier hat zur *Untersuchung der Hornhaut* folgendes Verfahren empfohlen: Die frisch abgetragene Cornea kommt auf 5 Minuten in frisch gepreſsten und filtrierten Zitronensaft, dann für 20 Minuten in 1 % Goldchloridlösung (mindestens 3 ccm. für jede Hornhaut) und endlich für 3—4 Tage dem Lichte ausgesetzt in 30 ccm. mit 2 Tropfen Essigsäure angesäuerten Wassers. Nach beendeter Reduktion wird ausgewaschen und in Alkohol langsam erhärtet.

5) **Marinescu'sche Goldmethode.** Dieselbe ist eine Modifikation der vorigen, gestattet aber eine ausgedehntere Anwendung als jene. Kleine Stücke des zu vergoldenden Objektes werden in Partikel *longitudinal zur Nervenrichtung* zerlegt. Diese letzteren kommen darauf in frisch bereiteten filtrierten Zitronensaft für 10—15 Minuten, werden dann sehr wenig ausgewaschen, mit Glasnadeln (ja nicht mit Metallnadeln) in einem Glasschälchen voll Wasser vorsichtig ein wenig zerzupft und in Goldchloridkaliumlösung von 0,5 % übertragen. Hierin werden sie dem diffusen Tageslichte (nicht Sonnenlicht) etwa 20 Minuten ausgesetzt, bis sie eine gelbliche Farbe angenommen haben. Man bewegt sie etwas während dieser Zeit mit einer Glaspinzette in der Goldlösung, wäscht sie danach unter Bewegen flüchtig in destilliertem Wasser ab und führt sie in Ameisensäure-Glycerin (1 Ameisensäure zu 10 Glycerin) über. Hier verbleiben sie im Dunkeln im Brütofen bei einer Temperatur von 27 ° C. (höhere Temperatur gibt schlechte Resultate) einige Tage bis zu 2 Monaten, bis das Glycerin einen violetten Ton angenommen hat. Von Zeit zu Zeit untersucht man zwischen zwei Objektträgern bei sehr schwacher Kompression, ob die Reduktion bereits eine genügende ist. In Glycerin wird dann zerzupft und aufgehoben.

6) **Flemming'sche Goldmethode.** Um bei *Mollusken* das Eindringen der Goldlösungen zu erleichtern, empfiehlt Flemming folgendes Verfahren: Die frischen Objekte kommen in Salzsäure von 0,1 % auf 1 Stunde, dann bis zu 12 Stunden in ¼ % Goldchloridlösung und werden in leicht mit Essigsäure angesäuertem Wasser bis zu 10 Tagen dem Lichte ausgesetzt. Langsames Erhärten in Alkohol und Schneiden nach Einbettung.

7) **Golgi'sche Goldmethode.** Man legt das frische Objekt auf

$^1/_4$—$^1/_2$ Stunde in eine $^1/_2$ % Arsensäurelösung, bringt dann nach kurzem Auswaschen in eine 1 % Lösung von Goldchloridkalium, in welcher die zu vergoldenden Teile bleiben, bis sie gelb geworden sind. Darauf werden sie in 1 % Arsensäurelösung übergeführt und zur Reduktion dem Sonnenlichte ausgesetzt.

8) **Osmiumgoldmethode von RETZIUS.** Man bringt die Objekte in eine $^1/_2$ % Osmiumsäurelösung. Nach $^1/_2$ Stunde wird in Wasser ausgewaschen und in eine $^1/_2$ % Goldchloridlösung für ebenfalls $^1/_2$ Stunde übertragen. Darauf Überführen in 2 % Ameisensäure für 24 Stunden.

b. Die Methoden der Versilberung.

9) **Salpetersaures Silber** nach RANVIER. Man verwendet Lösungen von 0,2 %—2 %. Die frischen Objekte kommen auf circa 1 Stunde in das Reagens, werden in destilliertem Wasser abgewaschen und ebenfalls in destilliertem Wasser 24—48 Stunden dem Tageslichte ausgesetzt. Man hüte sich, zum Abwaschen und zur Reduktion gewöhnliches Wasser zu nehmen; in diesem wird durch Ausbildung von Chlorsilber die Entstehung eines Silberalbuminates verhindert. Man zerzupft in verdünntem Glycerin und hebt darin auf; damit sich die Präparate halten, müssen sie im Dunkeln aufbewahrt werden, weil im Lichte allmählich eine diffuse Reduktion eintritt.

10) **Versilberung nach DECKHUYZEN.** Man spült die frischen Objekte zunächt in 1,3 % Kalisalpeterlösung ab, dann bringt man in eine 0,25 % Lösung von Argentum nitricum ein, welche 3 % Salpetersäure enthält, führt nach einigen Minuten in 96 % Alkohol und endlich in Nelkenöl über. Hierin tritt im Lichte sehr bald Reduktion ein. Man kann mit einem Alaunhämatoxylin, mit Safranin oder Methylgrün die Kerne nachfärben.

11) **GOLGI'sche Methode der Versilberung.** Dieselbe hat in neuester Zeit ausgedehnte Verwendung *zum Studium der Elemente des Zentralnervensystems der Vertebraten und Exertebraten*, sowie auch *zum Studium der peripheren Nervenverzweigungen* gefunden. *Die* GOLGI'sche *Vorschrift für Zentralnervensystem* ist folgende: 1—1$^1/_2$ ccm. grofse Stücke von Gehirn oder Rückenmark werden in MÜLLER'scher Lösung oder in Kali bichromicum von 2 %, dessen Konzentration schnell bis 5 % steigt, fixiert. Stets mufs sehr viel Flüssigkeit angewendet werden. Dauer der Einwirkung 14—50 Tage und mehr, je nach der Jahreszeit; in der heifsen ist weniger, in der kalten mehr Zeit erforderlich. Die gehärteten Objekte werden in ganz dünner Lösung von Argentum nitricum ausgewaschen und kommen dann in eine grofse Quantität einer 0,75 % Lösung des Silbersalpeter, die häufig zu erneuern ist. Es ist gleichgiltig, ob man das zu versilbernde Objekt dem Lichte aussetzt oder nicht. In der Silberlösung bleiben die Präparate 2—3 Tage und länger. Sie kommen dann auf kurze Zeit in 50 % Alkohol, dann in absoluten und werden entweder direkt oder nach kurzer Einbettung in Celloidin geschnitten. Die Schnitte dürfen nach der Montierung nicht mit einem Deckglase zugedeckt werden.

12) **Modifikation der GOLGI'schen Methode von FUSARI.** Für das *Gehirn der Knochenfische.* Kleine Stückchen des Organs kommen

für 2 Tage in MÜLLER'sche Lösung + $^1/_3$ des Volumen Wasser, dann für 2 Tage in ein gleiches Quantum reiner MÜLLER'scher Lösung. Aus derselben für 2 Tage in $^4/_5$ Müller + $^1/_5$ 1 % Osmiumsäure, dann endlich in 0,75 % Lösung von Argentum nitricum. Weitere Behandlung wie bei der ursprünglichen GOLGI'schen Methode.

13) **Modifikation von RAMÒN Y CAJAL.** Kleine Stückchen von Gehirn oder Rückenmark kommen auf mehrere Tage in eine Mischung von 2 % Kali bichromicum 8 Teile + 1 % Osmiumsäure 1 Teil. Dann werden sie in $^1/_2$ %—1 % Lösung von Argentum nitricum für 2 Tage übergeführt, in 40 %—50 % Alkohol kurz ausgewaschen, in Alkohol absolutus schnell erhärtet und nach Einbettung in Celloidin geschnitten.

14) **KÖLLIKER'sche Modifikation.** Härten kleiner Stückchen des Zentralnervensystems in 3 % Lösung von Kali bichromicum + 1 % Osmiumsäure zu gleichen Teilen, wechseln nach einigen Minuten und Auswaschen nach 24—36 Stunden in $^1/_4$ % Argentum nitricum-Lösung $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde. Dann Überführen in eine grofse Quantität 0,75 % Argentum nitricum-Lösung 30—48 Stunden, dann 40 % Alkohol kurze Zeit, Alkohol absolutus 1 Stunde, Celloidin und sofort schneiden.

Der Effekt bei der GOLGI'schen Methode und ihren Modifikationen ist der, dafs das in den Organen vorhandene Chromsalz mit dem salpetersauren Silber sich zu *chromsaurem Silberoxyd* verbindet. Dieses schlägt sich in oder auf den Nervenzellen, den Axencylindern und der Neuroglia nieder, welche infolgedessen bei durchfallendem Lichte schwarz erscheinen. Der Niederschlag ist oft nur ein geringer, oft aber erfolgt er in ergiebigster Weise und gestattet so eine Verfolgung der Ramifikationen der Ganglienzellen, wie sie mit den gewöhnlichen Methoden der Färbung, bisher wenigstens, nicht zu erreichen ist. Der Niederschlag erfolgt aber nicht in allen Zellen gleichmäfsig, sondern man findet immer nur einzelne Zellen durch Chromsilber geschwärzt oder vielmehr die Lymphräume um die Zellen und deren Ausläufer mit Chromsilber erfüllt — denn nur eine Ausfüllung der Lymphräume und nicht etwa eine Färbung findet statt —. Dadurch ist eine leichtere Übersichtlichkeit des mikroskopischen Bildes gewährleistet; aber dieser Vorteil wird durch *den* Nachteil, meines Erachtens wenigstens, paralysiert, dafs der Zusammenhang der Gebilde unter einander nicht zur Anschauung gebracht wird und dafs man daher leicht der Verführung unterliegt, das, was die Methode nicht zeigt, als nicht vorhanden anzunehmen. Hier liegt eine Fehlerquelle, auf die man, wie mir scheinen will, bisher viel zu wenig von Seiten derjenigen geachtet hat, welche sich der Chromsilbermethode zu ihren Arbeiten bedienten.

Ferner — und das ist auch ein Nachteil — ist es nicht leicht, Glia- und Ganglienzellen voneinander zu unterscheiden. Sind die letzteren z. B. nur auf kurze Strecken von dem Silberniederschlag umhüllt, so kann man kaum ein gutes Kriterium finden, sie von der ersteren Zellart sicher zu trennen. Man könnte höchstens sagen, sehen die Zellen häfslich aus, so sind sie Gliazellen, sehen sie hübsch aus, so sind sie Ganglienzellen. Immerhin aber werden die Resultate der Methode so lange zu beachten sein, bis es möglich sein wird, auf rationellere Weise als durch die launische Metallimprägnation die Zellen und ihre Ausläufer im Zentralnervensystem und in der Peripherie in voller Ausdehnung zur Anschauung zu bringen.

15) **GOLGI'sche Chromquecksilbermethode.** Man härtet *Gehirn und Rückenmark* in Kali bichronicum oder in MÜLLER'scher Lösung. Nach *beendeter* Härtung wird *direkt* in eine Sublimatlösung von 0,25 %, 0,5 %—1 % übertragen. Dieselbe ist öfters zu wechseln, in ihr entfärben sich die Objekte fast völlig; dann wird nach gutem Auswaschen in Alkohol nachgehärtet und geschnitten. Die Entfärbung dauert oft Monate; im Sublimat können die Teile unbegrenzte Zeit bleiben. Hier sind die Zellen durch ein Quecksilberchromat gefärbt. Da diese Methode sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, so nennt man sie auch die *langsame*, während die Chromsilbermethode die *schnelle* GOLGI'sche *Methode* heifst. Wegen der langen Zeit, die man bedarf, ist die Methode wenig beliebt geworden.

Kap. IX. Das Aufheben der Präparate.

Präparate, die ohne weitere Vorbereitung von frischem Materiale angefertigt und in indifferenten Flüssigkeiten untersucht wurden, sind aus leicht ersichtlichen Gründen einer dauernden Aufbewahrung nicht fähig. Das Gleiche gilt im allgemeinen von Zupfpräparaten, die man nach kürzerem oder längerem Verweilen in einer der in Kap. II beschriebenen Isolationsflüssigkeiten hergestellt und keiner weiteren Nachbehandlung unterworfen hat.

Präparate dagegen, welche nach der Mazeration gefärbt wurden, Osmium-, Gold- und Silberpräparate sowie die von fixiertem Materiale angefertigten Schnitte können dauernd aufbewahrt werden.

Man unterscheidet zwei Arten des Aufhebens: *feuchtes* und *trockenes* Aufheben. Feucht hebt man meist nur Zupfpräparate auf, während Schnitte nur selten mit dieser Methode behandelt werden; umgekehrt werden Schnitte meistens trocken aufbewahrt, während man dies Verfahren bei Zupfpräparaten nicht anwendet. Das trockene Aufheben, oder vielmehr die Manipulationen zu demselben nennt man auch *das Montieren der Präparate.*

a. Feuchtes Aufheben.

1) **Glycerin.** Gefärbte Objekte zerzupft man, nachdem man sie in Wasser ausgewaschen hat, entweder in reinem oder halb mit destilliertem Wasser verdünnten Glycerin. Das *reine* Glycerin hat viele Nachteile. Einmal macht es die Präparate zu durchsichtig, sodafs namentlich feinere Strukturen dadurch verschwinden. Dann entzieht es den Geweben zuviel Wasser und bewirkt dadurch nachträglich mehr oder minder bedeutende, das Präparat wertlos machende Schrumpfungen. Endlich drittens zieht es namentlich die Anilinfarben, aber auch das Hämatoxylin (Hämatein) sehr stark aus, sodafs Präparate, die beim Einlegen eine ziemlich intensive Tinktion zeigten, nach kurzer Zeit völlig abgeblafst sind. *Viel besser* ist es daher, halb mit Wasser verdünntes Glycerin zu nehmen.

Bei der Anwendung dieses Mittels hat man in erster Linie zu beachten, dafs man den Tropfen, in dem die Zerzupfung vorgenommen wird, nicht zu klein und nicht zu grofs nimmt. Hat man zuviel Glycerin genommen, so schwimmt beim Anflegen des Deckglases das Zerzupfte nach allen Richtungen auseinander und das Glycerin tritt

über den Rand des Deckglases hervor, wodurch das Umranden fast zur Unmöglichkeit wird. Hat man zu wenig genommen, so treten beim Auflegen des Deckglases eine Unmenge kleinster Luftblasen im Präparate auf, welche dessen schnelles Verderben herbeiführen. Das richtige Mafs zwischen beiden Extremen zu finden ist nicht leicht, dazu bedarf es vieler Übung.

2) 50 % **Kali aceticumlösung.** Statt des Glycerins sollte man sich mehr der von Max Schultze empfohlenen 50 % wässrigen Lösung des Kali aceticum bedienen. Sie besitzt alle Vorteile des reinen und verdünnten Glycerins, ohne an dessen Übelständen Anteil zu haben; namentlich Osmiumzupfpräparate halten sich in ihm viel besser, als in Glycerin. Anilinfarben blassen aber mit der Zeit auch aus.

Bei Präparaten, die in Glycerin oder Kali aceticum feucht aufbewahrt werden sollen, *müssen die Deckgläser noch umrandet werden*, weil sonst bei der geringsten Neigung der Objektträger zur Horizontalen dieselben wegschwimmen würden. Man bedient sich zur Erreichung dieses Zweckes der sogenannten Verschlufslacke, von denen die nachstehend verzeichneten die zuverlässigsten sind. Die Zahl der empfohlenen Verschlufslacke ist eine sehr grofse, von denen sich aber nur wenige haben einbürgern können.

3) **Umrandung mit Wachs.** Diese Methode ist die einfachste, billigste und meines Erachtens sicherste. Man thut gut, dieselbe auch da anzuwenden, wo man sich eines der drei folgenden Verschlufsmittel bedienen will. Man umrandet erst mit Wachs und überzieht dann die Wachsschicht mit dem Lack.

Man nimmt ein dünnes Wachslicht, zündet es für einen Augenblick an, sodafs das im Dochte enthaltene Wachs schmilzt, löscht aus und fährt nun rasch aber vorsichtig, damit das Deckglas nicht verschoben wird, mit dem noch warmen Dochte an dem Rande des Deckglases hin. Der Docht hinterläfst einen schnell erstarrenden Streifen Wachs, welcher das Deckglas auf dem Objektträger befestigt, vorausgesetzt, dafs man so umrandet hat, dafs der Wachsstreifen zur Hälfte auf dem Deckglase, zur Hälfte auf dem Objektträger ruht. Man setzt die Prozedur des Anzündens, Auslöschens und Aufstreichens so lange fort, bis ein genügend breiter Rahmen von Wachs das Deckglas fixiert. Solcher Art hergestellte Präparate halten sich sehr lange.

4) **Asphaltlack.** Er stellt eine Auflösung von Asphalt in Lein- und Terpentinöl dar und kommt in dieser Form im Handel vor. Trocknet schwer und wird leicht spröde, ist daher *wenig empfehlenswert.*

5) **Maskenlack.** Er ist eine alkoholische Lösung, deren Zusammensetzung ich nicht kenne, ist *viel besser als Asphaltlack*, da er sehr schnell hart wird ohne zu springen. Im Handel vorrätig. Ist der Lack zu dickflüssig, so verdünne man ihn mit einigen Tropfen Alkohol von 96 %.

6) **Krönig'sche Masse.** Dieselbe besteht aus weifsem Wachs 2 Teilen und Kolophonium 9 Teilen, welche in der Wärme vereinigt werden. Die nach dem Erkalten harte Masse wird mit heifsgemachter Messerklinge auf den Rand des Deckglases aufgetragen. Nächst Masken-

lack *eines der besten Umrandungsmittel,* da es sich gut anlegt, schnell erstarrt und nicht brüchig wird.

b. Trocknes Aufheben.

Um Schnitte von fixiertem Materiale dauernd aufzubewahren, empfiehlt es sich nicht, dieselben in Glycerin oder Kali aceticum zu bringen, sondern sie in einem der unten zu erwähnenden Harze einzuschliefsen. Diese Harze werden nach mehr oder minder langer Zeit hart und trocken — daher trockenes Aufheben —, die Präparate sind infolgedessen nicht so leicht den Gefahren der Zerstörung ausgesetzt, wie bei dem feuchten Aufheben. Bei letzterem kann die Umrandungsmasse abspringen, dadurch verschiebt sich das Deckglas oder es dringt leicht Luft unter dasselbe und verdirbt die Präparate oder die Aufhebungsflüssigkeit tritt unter dem Deckglase hervor und die Präparate vertrocknen. In den Harzen halten sich die Farbennüancen lange Zeit, oft viele Jahre, unverändert, sodafs einmal hergestellte Präparate sehr lange aufbewahrt und als Vergleichsobjekte herangezogen werden können. Die gröfsere Umständlichkeit in der Anwendung der Harze wird daher durch die mit derselben verknüpften Vorteile mehr als ausgeglichen.

Ohne weiteres sind die gefärbten Schnitte nicht einzuschliefsen. Zunächst mufs man sie sorgfältig in absolutem Alkohol oder mindestens in 96 %, der für die meisten Fälle ausreicht, *entwässern.* Celloidinschnitte dürfen in absolutem Alkohol nicht zu lange verweilen, weil sonst das Celloidin leicht schmierig wird.

Nach der Entwässerung *können sie direkt in* den unten zu erwähnenden *Kanadabalsam übertragen werden,* nach der Empfehlung von G. Fritsch. Doch ist das nicht ganz ungefährlich; denn ist auch nur eine Spur von Wasser in den Schnitten noch vorhanden, so dringt der Balsam nicht ein und die Schnitte verderben. Besser ist es daher, will man nicht in Kanadabalsam oder Dammarlack aufheben, sich des folgenden Mittels zu bedienen.

7) **Venetianisches Terpentin.** Vosseler, der dieses Einschlufsmittel in die histiologische Technik eingeführt hat, gibt für dessen Verwendung folgende Vorschrift: Der rohe, in jeder einigermafsen gut ausgerüsteten Droguenhandlung käufliche Balsam wird in einem hohen cylindrischen Glasgefäfse mit dem gleichen Volumen Alkohol von 96 % vermischt und in einen Wärmeschrank, der die zum Paraffinschmelzen geeignete Temperatur hat (60—62° C.), gestellt. Nach 24 Stunden haben sich die Unreinigkeiten zu Boden gesetzt, über ihnen steht eine dickflüssige, dunkelgelbe und klar durchsichtige Masse, die man vorsichtig in ein mit Korken verschliefsbares weithalsiges Glasgefäfs abgiefst. Zum Gebrauche verdünnt man sich von dieser Stammmischung das nötige Quantum mit so viel Alkohol von 96 %, dafs die gewünschte Konsistenz erreicht wird. In einem Tropfen dieser Lösung, den man auf den Objektträger bringt, schliefst man die direkt dem zur Entwässerung verwendeten 96 % Alkohol entnommenen Schnitte ein. Im venetianischen Terpentin werden die Schnitte aufgehellt und aufbewahrt, da dasselbe mit der Zeit so hart wie Kanadabalsam wird.

Es ist unleugbar ein *grosser Vorzug* dieses Mittels, dafs man ohne Aufhellung direkt einschliefsen kann. Ein *grosser Nachteil* aber besteht

darin, dafs das venetianische Terpentin ganz aufserordentlich langsam erhärtet. Noch nach Monaten ist dasselbe weich und die Präparate sind daher gefährdet, namentlich wenn man nach Gebrauch von homogener Immersion die Deckgläser reinigen will.

8) **Terpentinöl.** Zur Aufhellung ist Terpentin für sich allein *nur bei Schnitten von durchgefärbtem Materiale* verwendbar. Im Wärmekasten oder auf dem Neapler Wasserbade, wo die auf den Objektträgern aufgeklebten Schnitte sich befinden, damit sie festkleben, schmilzt gleichzeitig das Paraffin. Man gieſst nun über den warmen Objektträger Terpentinöl, welches alles Paraffin wegnimmt, läfst ablaufen und bringt einen Tropfen Balsam oder Dammarlack auf, über den man ein Deckgläschen legt.

Die Deckgläser werden so aufgelegt, dafs man sie mit einer feinen Pinzette faſst, dann zunächst nur mit einer Kante derselben den Objektträger berührt, während man ihrer Fläche eine leichte Neigung zum Objektträger gibt. Indem man das Deckglas senkt und die Pinzette dabei langsam fortzieht, bewirkt man eine gleichmäfsige Ausbreitung des Kanada- oder Dammartropfens und verhütet den Eintritt von Luftblasen.

Schnitte, die nicht von durchgefärbtem Materiale stammen, mufs man *aufhellen,* ehe man sie einschliefsen kann. Man verwendet dazu nicht Terpentinöl allein, sondern bedient sich besser eines der folgenden *Aufhellungsmittel.*

9) **Bergamottöl.** Dieses sehr angenehm riechende Öl bewahrt man am besten in einer Flasche auf, in welche eine Pipette als Glasstöpsel eingeschliffen ist. Deckgläser, auf denen Schnitte aufgeklebt sind, nimmt man aus dem Alkohol und legt sie auf ein kleines Uhrschälchen so auf, dafs die Schnitte nach oben kommen und die vier Ecken nur lose auf dem Schälchen ruhen, das ganze Deckglas also hohl liegt. Dann gibt man mit der Stöpselpipette einige Tropfen Öl auf die Schnitte. Hat man auf dem Objektträger aufgeklebt, so hält man denselben, nachdem man den überschüssigen Alkohol hat abtropfen lassen, wagerecht und tropft Öl auf die Schnitte. Sind letztere durchsichtig geworden, was beim Bergamottöl einige Minuten dauert, so saugt man das Öl möglichst vollständig mit der Stöpselpipette von dem Deckgläschen ab, bez. gieſst dasselbe vom Objektträger in die Ölflasche zurück, trocknet noch einmal zwischen zwei Blättern Filtrierpapier vorsichtig ab, bringt auf den Objektträger einen Tropfen Balsam oder Dammarlack und legt das Deckgläschen vorsichtig auf. Sind die Schnitte auf letzterem aufgeklebt, so müssen dieselben natürlich nach unten gelegt werden. *Für Paraffin- und Celloidinschnitte geeignet.*

10) **Nelkenöl.** Man hellt mit diesem Öl in der gleichen Weise auf, wie mit dem vorigen. Dasselbe hat den Nachteil, dafs es die Anilinfarben zu stark auszieht und bei Celloidinschnitten das Celloidin löst. Ich wende daher Nelkenöl jetzt fast gar nicht mehr an.

11) **Kreosot-Terpentinöl.** Schnitte von Material, das nach der Golgi'schen Chromsilbermethode behandelt wurde, kommen aus dem absoluten Alkohol auf einige Minuten in Kreosot, in welchem sie aufgehellt werden. Aus demselben werden sie in Terpentinöl übergeführt, welches das Kreosot verdrängt, und werden dann in Dammar aufgehoben.

12) **Weigert'sche Aufhellung.** Die Schnitte, welche mit der Weigert'schen Kollodiummethode aufgeklebt waren, kommen aus dem 90 % Alkohol — die Kollodiumlappen dürfen nicht in 96 % Alkohol gebracht werden, da sich darin das Kollodium lösen würde — in eine Mischung von 3 Volumina Xylol mit 1 Volumen Acidum carbolicum liquefactum. Um letzteres Reagens stets wasserfrei zu erhalten, bringt man auf den Boden des Gefäfses, in dem die Mischung sich befindet, etwas geglühtes Cuprum sulfuricum. In der Mischung bleiben die Lappen, bis sie durchsichtig geworden sind.

Die zum dauernden Einschluſs bestimmten Mittel sind aufser venetianischem Terpentin (siehe oben) Kanadabalsam und Dammarlack.

13) **Kanadabalsam.** Man löst in einem Glasgefäfse, das mit einem aufgeschliffenen Deckel bedeckt wird und in welchem sich ein feiner Glasstab zum Auftropfen des Balsams befindet, den dickflüssigen, käuflichen Balsam in Xylol, sodafs er die gewünschte Konsistenz erreicht. Zu dünn darf er nicht werden, weil dann nach dem Verdunsten des Xylols beim Hartwerden der Balsam den Raum unter dem Deckglase nicht mehr ausfüllt. Xylol als Lösungsmittel ist dem Terpentin vorzuziehen, da in Terpentinbalsam difficile Farben abblassen. Dickflüssiger Terpentinbalsam ist zum Einschliefsen von Knochenschliffen empfehlenswert.

Man muſs unter allen Umständen nur wenig Balsam nehmen, nur so viel, dafs der vom Deckglase bedeckte Raum gerade ausgefüllt ist. Nimmt man zu viel, so hat man einen doppelten Nachteil. Erstens trocknet eine solche dicke Balsamschicht sehr schwer, ist oft nach Monaten noch nicht fest. Und zweitens wird durch dieselbe die Beobachtung mit starken Trockensystemen dann sehr erschwert, wenn die Schnitte gar nicht oder auf dem Objektträger aufgeklebt waren. Dann hindert die Balsamschicht zuweilen die genaue Einstellung des Systems. *Hierauf beruht auch der Vorteil des Aufklebens auf dem Deckglase;* da ist in allen Fällen zwischen Präparat und Linse aufser dem Deckglase nur die kapillare Schicht Balsam, welche sich zwischen Präparat und Deckglas befindet.

14) **Dammarlack.** Dieses Reagens besitzt vor dem Kanadabalsam den Vorzug, dafs es für die Erhaltung feinerer Strukturen günstiger ist. Man bereitet sich am besten die Lösung selber; fertig gekaufter Lack wird häufig im Präparate trübe. Man löst Dammarharz, das sehr rein aussehen muſs, in einem Gemisch von Benzin und Terpentin zu gleichen Teilen in der Wärme und filtriert warm. Ist der Lack in der Flasche trotz sorgfältiger Zubereitung trübe geworden, so bringt man ihn nach der Angabe von Flemming bei 50—80 ° C. eine Zeitlang in den Brütofen und filtriert ihn dann warm durch ein mit Chloroform benetztes Fliefspapier. Dann bleibt der Lack wieder längere Zeit klar.

Kap. X. Die Methoden der Injektion.

Allgemeine Bemerkungen.

Um die Vascularisation der einzelnen Organe genauer zu studieren, ist es notwendig, die Gefäfse dadurch sichtbar zu machen, dafs man

sie mit einer farbigen, transparenten Masse erfüllt. Für diesen Zweck, *die Injektion*, gibt es zwei Methoden, die Einspritzung *warmer* und die Einspritzung *kalter* Flüssigkeiten, von denen die letzteren flüssig bleiben, die ersteren in der Kälte erstarren. Der Modus procedendi ist dabei der, dafs man in die *Hauptarterie* oder in *die Hauptvene* eines Organes eine Kanüle einsticht und einbindet, diese dann mit einer Spritze vereinigt, deren Stempel man kontinuierlich unter stets gleichem Drucke langsam vorschiebt, bis die Injektion vollendet ist, d. h. bis das Organ eine gleichmäfsige, der Farbe der Injektionsmasse entsprechende Färbung angenommen hat. Will man Arterie und Vene gleichzeitig injizieren, so hat man natürlich zwei Kanülen einzubinden, die mit zwei Spritzen in Verbindung zu setzen sind, oder kann erst die Verzweigung der Arterie, dann die der Vene mit den Injektionsmassen ausfüllen. Vor der Injektion der gefärbten Flüssigkeiten thut man gut, die Gefäfse mit 0,75 % Kochsalzlösung so lange zu durchspritzen, bis die Lösung klar aus der Vene abläuft; man verhütet so die Bildung von Blutgerinnseln.

Zur *Injektion der Lymphgefäfse* bedient man sich des *Einstichverfahrens*. Man macht dabei mit einer in die Injektionsmasse getauchten Staarnadel oder mit einer feinen, ebenfalls in die Injektionsmasse getauchten Scherenspitze einen kleinen Einstich in das Organ, schiebt in denselben, der sich als gefärbter Punkt präsentiert, die Kanüle vorsichtigt ein, verbindet mit der gefüllten Spritze und füllt durch Vordrücken des Stempels derselben die Lymphbahnen an.

Nimmt man *warme* Massen, so müssen die Instrumente die Temperatur der Massen haben und die Organe, welche injiziert werden sollen, in warmem Wasser liegen. Die Injektion hat selbstverständlich der Fixierung und Härtung vorauszugehen. Von injizierten Organen gemachte Schnitte kann man zur Deutlichmachung der zelligen Elemente in einem beliebigen Farbstoffe nachfärben, am besten in einem solchen, welcher eine Kontrastfärbung zur Injektionsmasse hervorbringt, oder man kann das ganze Organ durchfärben. Injizierte Organe fixiert und härtet man am besten nach beendeter Injektion in absolutem Alkohol.

Als Kanüle bedient man sich entweder der mit den käuflichen Spritzen mitgegebenen Metallansätze oder feiner Glasröhren, deren eines Ende über der Stichflamme in eine feine Spitze ausgezogen ist.

Statt der Spritzen, deren Stempel man mit der Hand vorschieben mufs, wodurch zuweilen die Druckintensität geändert wird, kann man sich, namentlich bei kaltflüssigen Massen, eines *Apparates mit konstantem Druck* bedienen. Man hat dazu zwei grofse Flaschen nötig, von denen jede mit einem doppelt durchbohrten Korke verschlossen wird. In die eine Flasche kommt die Injektionsmasse, in die eine Öffnung des zugehörigen Korkes derselben wird eine bis auf den Boden reichende, an ihrem oberen Ende rechtwinklich gebogene Röhre gesteckt, an deren freier Mündung ein mit der Injektionskanüle versehener Schlauch befestigt wird. In die andere Korköffnung kommt eine doppelt knieförmig gebogene Glasröhre, deren Mündung nur wenig über das untere Ende des Korkes in die Injektionsflasche reicht, die Injektionsmasse aber nicht berühren darf. Die zweite Flasche ist der Windkessel. In die eine Öffnung des zugehörigen Korkes kommt der noch unbesetzte Schenkel der doppelt knieförmig gebogenen Röhre, der nur bis dicht unter den Kork reicht. In die andere Öffnung kommt ein mit einem Trichteransatze versehenes, sehr hohes und nicht zu weites

Steigrohr, das bis auf den Boden des Windkessels reicht und durch ein geeignetes Stativ lotrecht erhalten wird. Gieſst man nun in den Trichteransatz Quecksilber, so läuft dieses in den Windkessel und komprimiert dadurch die Luft, welche nach der Injektionsflasche durch die doppelt knieförmige Röhre entweicht und dadurch die Injektionsmasse aus leicht ersichtlichen Gründen in die Kanüle treibt.

Zu *warmen farbigen Injektionsmassen* existiert eine sehr groſse Anzahl von Vorschriften, von denen hier nur drei, die nach FREY zitiert sind, Erwähnung finden sollen. Nach diesen kann man sich nach Geschmack andere Färbungen beliebig herstellen.

1) **GERLACH'sche Karminmasse.** 5 gr. feinsten Karmins werden in 4 ccm. Wasser und $^1/_2$ ccm. Liquor ammonici caustici gelöst. Man läſst die Mischung mehrere Tage lang in nicht zu fest verschlossenem Gefäſse stehen und bringt sie dann in eine konzentrierte Lösung feiner weiſser französischer Gelatine. Letztere stellt man so dar, daſs man 6 gr. Gelatine in 80 ccm. Wasser in der Wärme löst. Nach Vereinigung des Karmins mit der Gelatine wird durch einige Tropfen Essigsäure neutralisiert und bei einer Temperatur von 40—45 ° C. injiziert.

2) **Berliner Blau mit Oxalsäure von HARTING.** 1 Teil Oxalsäure wird in einem Mörser zerrieben, dazu dann 1 Teil Berliner Blau gesetzt. Unter stetem Reiben werden 12 Teile Wasser zugefügt und die Lösung mit 12 Teilen warmer Leimmasse vermengt.

3) **Transparentes Gelb nach THIERSCH.** 1 Teil einer wässrigen Lösung von einfach chromsaurem Kali (1 : 11) wird mit 4 Teilen einer konzentrierten Leimlösung vermischt, die man aus feiner weiſser französischer Gelatine hergestellt hat. 2 Teile einer wässrigen Lösung salpetersauren Bleioxyds (1 : 11) werden mit 4 Teilen konzentrierter Leimlösung vermengt. Bei einer Temperatur von 25—32 ° C. werden langsam und vorsichtig unter beständigem Umrühren beide Mischungen miteinander vereinigt und dann etwa 1 Stunde lang auf 70—100 ° C. auf dem Wasserbade erhitzt. Filtriert wird durch Flanell.

4) **Kaltflüssige Injektion mit Berliner Blau unter konstantem Druck nach PAUL MAYER.** Die *Injektionsflüssigkeit* wird folgendermaſsen hergestellt: Man löst, da das käufliche Berliner Blau selten gut ist, 20 gr. gelbes Blutlaugensalz (Ferrocyankalium) in 500 ccm. Wasser, verdünnt 10 ccm. des Liquor ferri sesquichlorati der deutschen Pharmakopoe mit ebenfalls 500 ccm. Wasser, gieſst unter stetem Umrühren die zweite Lösung in die erste, so daſs stets ein Überschuſs von Blutlaugensalz vorhanden ist, und lässt 12 Stunden lang stehen. Dann wird die gelbe Lösung, so gut es geht, abgegossen, die blaue Lösung wird filtriert und man wäscht nun mit destilliertem Wasser so lange aus, bis das Filtrat tiefblau ist. Das dauert 1—2 Tage. Das tiefblaue Filtrat wird aufgefangen; der Niederschlag auf dem Filter wird durch wiederholtes Aufgieſsen von Wasser völlig aufgelöst. So erhält man 1 Liter Flüssigkeit. Um bei Injektion derselben in alkalisch reagierenden Organen ein Ausblassen der Farbe zu verhüten, muſs man mit etwas Essigsäure ansäuern.

Die *Injektion* geschieht mittels *konstanten* Drucks. Man bringt an einer etwa 10 Liter fassenden leeren Flasche in geeigneter Weise

ein Doppelgebläse an, wie es beim Spray verwendet wird. Durch wiederholtes Zusammendrücken des Gummiballons wird die Luft in der Flasche komprimiert und da diese mit dem Gefäfse in Verbindung steht, welches die Injektionsflüssigkeit enthält, so wird letztere in die in geeigneter Weise angebrachte Kanüle getrieben. Zur Messung des Druckes ist an der Luftflasche ein Manometer vorhanden.

5) **Altmann'sche Korrosionsmethode.** Altmann injiziert die Gefäfse eines Organes mit einem Gemisch aus 2 Teilen Oleum Ricini und 1 Teil Alkohol. Die injizierten Organe kommen darauf in 1% Osmiumsäure, bis sie völlig schwarz sind, was etwa 1—2 Tage dauert; dann wird in Alkohol gehärtet. Schnitte, die nun angefertigt werden, behandelt man mit Eau de Javelle. Die Dauer der Einwirkung dieses Reagens richtet sich nach dem Objekte. Es werden durch dasselbe alle zelligen und bindegewebigen Teile zerstört und nur die Gefäfse bleiben übrig. Die Schnitte dürfen nicht zu dünn sein.

6) **Injektion mit Silbersalpeter.** Zur Darstellung der endothelialen Zusammensetzung der *Kapillaren* injiziert man kleine Gefäfsbezirke mittels einer Pravaz'schen Spritze mit einer $^1/_2$%—1% Lösung von Argentum nitricum. Nach Vollendung der Reduktion des Salzes, die man an der Bräunung erkennt, kann in Alkohol gehärtet werden.

Kap. XI. Zeichnen und plastische Rekonstruktion.

a. Zeichnen.

Um überhaupt mikroskopisch sehen zu lernen, empfiehlt es sich für den Anfänger, *unter allen Umständen* von den Präparaten, die er entweder selber angefertigt hat oder die ihm zum Studium übergeben wurden, eine Zeichnung anzufertigen. Möge dieselbe auch noch so unvollkommen ausfallen, der didaktische Wert selbst einer schlechten Zeichnung ist meines Erachtens ein ganz aufserordentlicher. In den Übungskursen und beim Kolleg zeichnet der Lehrende das mikroskopische Bild auf und sagt dem Lernenden, was er zu sehen hat. Die meisten derselben trauen dem Worte ihres Lehrers und glauben auch wirklich das zu sehen, was sie sehen sollen, sehen aber häufig in Wahrheit nichts. Hier liegt eine Art des Selbstbetrugs vor, die nach jeder Richtung hin bedenklich erscheint. Ihr ist es zu verdanken, dafs man so oft sogenannte „Geübtere" trifft, die selbständig arbeiten wollen und nicht eine Ahnung vom mikroskopischen *Sehen* besitzen. Wird der Lernende aber von Anfang an angehalten, das was er sieht zu zeichnen, dann hört jeder Selbstbetrug auf. In dem Momente, wo der Bleistift auf dem Papiere das nachbilden soll, was das Auge im Mikroskope erblickt, mufs sich der Lernende Rechenschaft über sein Sehen geben. prüft er sehr genau das Bild, das er vor sich hat; denn wenn die meisten Menschen auch geneigt sind, sich einzureden, sie sehen etwas und verstünden was sie sehen: schwarz auf weifs belügen sie sich selber nicht oder nur selten. Das erziehliche Moment, das im Zeichnen liegt, nämlich die Anleitung zur Selbstkritik und zur Gewissenhaftigkeit, wird, wie mir scheinen will, noch vielfach nicht genügend gewürdigt.

Wenn der produktiv arbeitende Forscher seine Beobachtungen

andern zugänglich machen will, so bedarf er zur Illustration seiner Worte der Zeichnung. Nicht jeder Mensch hat von der Natur die Begabung erhalten, das, was er sieht, getreu ohne weitere Hilfsmittel nachbilden zu können. Denn für den Forscher ist es wichtig, dafs er genau das wiedergibt, was er Neues gefunden, während bei dem nur reproduktiv arbeitenden Schüler die unbedingte Genauigkeit Cura posterior ist gegenüber dem Versuche, das Gesehene *überhaupt* nachzubilden. Wir bedürfen daher bei unseren mikroskopischen Arbeiten zur Wiedergabe des Gesehenen einer Unterstützung unserer Hand und diese Unterstützung gewähren uns die *Zeichenapparate*.

Es gibt zwei Arten solcher Apparate der sogenannten *Camera lucida*, den Oberhäuser'schen und den Abbe'schen Apparat.

Der **Abbe'sche Zeichenapparat** besteht aus einem geeignet gefafsten Prisma, welches auf das Okular aufgesetzt wird, und aus einem mit demselben durch einem Hebelarm verbundenen, vom Mikroskopstative seitlich abstehenden Planspiegel. Bringt man in der Höhe des Mikroskoptisches das Zeichenpapier an, so wirft der Planspiegel das Bild desselben in das Prisma, dieses reflektiert von einer versilberten Fläche das Bild in das Mikroskop, während der Beobachter durch eine in der versilberten Prismafläche angebrachten Öffnung in das Mikroskop sieht. Hält man nun den Bleistift auf das Zeichenpapier, so erblickt man denselben im Mikroskope und kann somit genau die Konturen und eventuell das Detail des Bildes nachzeichnen. Seitlich vom Prisma, auf dem Wege der vom Planspiegel reflektierten Strahlen, befindet sich eine Vorrichtung, um Rauchgläser einzuschalten und dadurch die Lichtstärke des reflektierten Bildes zu mindern. Das ist eine sehr wertvolle und sehr praktische Einrichtung. Häufig, namentlich wenn man bei stärkeren Systemen zeichnen will, ist die Papierfläche so hell, dafs das mikroskopische Bild im Lichte gewissermafsen ertränkt ist; man sieht daher gar nichts. Schiebt man ein Rauchglas ein, so tritt das Präparat deutlich hervor.

Beim Zeichnen mit der Abbe'schen Camera mufs man beachten, dafs, je weniger intensiv das mikroskopische Bild ist, je lichtstärker also die Papierfläche ist, um so deutlicher die Bleistiftspitze zu sehen ist. Und umgekehrt, je lichtschwächer die Papierfläche ist, je deutlicher also die Einzelheiten des Präparates wahrzunehmen sind, um so undeutlicher erscheint die Bleistiftspitze. Zuweilen ist selbst bei voller Abblendung, also bei Anwendung der beiden dem Apparate mitgegebenen und verschieden dunklen Rauchgläser, die Papierfläche noch so hell, dafs das Präparat kaum zu erkennen ist. Dann mufs man die Papierfläche dadurch etwas verdunkeln, dafs man zwischen sie und das Fenster einen undurchsichtigen Gegenstand schiebt, der aber natürlich den Spiegel des Mikroskopes nicht verdecken darf.

Es ist eine lange Übung und grofse Geduld erforderlich, um mit dem Zeichenapparate *bei jeder Beleuchtung* gut arbeiten zu können — die Intensität des Tageslichtes ist, wie ohne weiteres klar sein wird, von hervorragender Bedeutung für das Zeichnen — und man wird *nur* dann etwas erreichen, wenn man sich über das Mifslingen Rechenschaft zu geben sucht. Das ist hier wie in allen Dingen die erste Bedingung zu einer richtigen Erkenntnis. In erster Linie gebe man bei mifslungenen Versuchen nicht dem Instrumente Schuld, sondern sich selber, denn man kann in 99 Fällen von 100 sicher sein, dafs das Instrument Recht hat.

Die **OBERHÄUSER'sche Camera** besteht ebenfalls aus einem Planspiegel und einem Prisma, doch ist hier die Anordnung gerade umgekehrt wie bei dem ABBE'schen Apparate. Der Planspiegel, der in einem Winkel von 45° feststeht, wird über das Okular gesetzt und wirft durch einen innen geschwärzten Tubus das Licht in das Prisma, welches seitlich übersteht. Der *Vorteil*, der dadurch erreicht ist, besteht darin, dafs Verzeichnungen bei diesem Instrumente völlig ausgeschlossen sind, während sie beim ABBE'schen Apparate infolge nicht genauer Spiegeleinstellung leicht vorkommen. Der *Nachteil* dagegen liegt darin, dafs das reflektierte Bild ziemlich lichtschwach ist. Bei diesem Instrumente wird das mikroskopische Bild auf die Papierfläche projiziert und durch das Prisma betrachtet. Es ist daher unter den meisten Umständen nötig, das Papier durch das Einschieben eines undurchsichtigen Gegenstandes zwischen dasselbe und das Fenster weniger intensiv belichtet zu lassen.

Der OBERHÄUSER'sche Apparat verzeichnet, wie gesagt, gar nicht und das ist von grosser Wichtigkeit bei embryologischen Untersuchungen, bei welchen ein schlecht gezeichnetes Bild die Glaubwürdigkeit der ganzen Arbeit erschüttern kann. Für diese Zwecke ist besonders empfehlenswert der von HIS konstruierte und von HARTNACK in ausgezeichneter Qualität gelieferte *Embryograph*.

Wie man zeichnen will, ist ziemlich gleichgiltig; man kann die Konturen erst mit einem sehr weichen Bleistifte nachziehen, dann ausradieren und nun nach dem zurückbleibenden Eindrucke auf dem Papier die Zeichnung anfertigen. Oder aber man kann mit einem sehr harten Bleistifte das Bild in zarten Linien nachzeichnen, die dann nach Abnahme des Zeichenapparates ihre definitive Stärke erhalten. Zuweilen ist es notwendig, zwei oder mehr Bilder zu kombinieren, weil eine Struktureigentümlichkeit sich auf zwei oder mehr Schnitte verteilt und es nicht die Aufgabe sein kann, sklavisch in jedem Falle nur die gerade vorliegende Schnittebene zu zeichnen, sondern weil das Bestreben dahin gerichtet sein mufs, die wirklichen Verhältnisse zu reproduzieren.

b. Plastische Rekonstruktion.

Bei embryologischen Arbeiten ist es von Wichtigkeit, sich eine körperliche Anschauung *der* Organisationsverhältnisse zu verschaffen, die durch die Anfertigung von Schnitten unmöglich gemacht wurde und die durch Präparation zu erkennen die Kleinheit des Materiales verbot. Hier mufs man sich das körperliche Bild zu *rekonstruieren* suchen.

Zunächst hat man eine sogenannte *Definierebene* — der sehr glücklich gewählte Ausdruck stammt von KASTSCHENKO — am Paraffinblock anzubringen. Thut man dies nicht, so wird man bei der Rekonstruktion ein ganz falsches Bild bekommen, z. B. einen geraden Kanal erhalten, wo in Wirklichkeit ein gebogener vorhanden ist. Denn es genügt nicht, die gezeichneten Schnitte mit ihren Rändern aufeinander zu legen, da die Konturen des Objektes nur in den seltensten Fällen geradlinige sind. Nach KASTSCHENKO schneidet man sich den Paraffinblock zurecht, in welchem das durchgefärbte Präparat steckt, und bestreicht seine Seiten ganz gleichmäfsig mit einer dunklen, in Terpentinöl nicht löslichen Masse, etwa Maskenlack. Nachdem der Auf-

strich getrocknet ist, gibt man von neuem hartes Paraffin auf und schneidet.

Man kann bei der Anbringung der Definirebene nach Strasser auch so verfahren, dafs man an dem zurechtgeschnittenen Paraffinblock mittelst eines Instrumentes, des sogenannten *Ritzers*, ein System feiner Rillen anbringt, welche senkrecht zur Schnittebene stehen. Darauf bestreicht man den Block mit feinem Rufs, der sich in die Rillen einlegt, wischt den überschüssigen ab und überzieht mit einer alkoholischen Schellacklösung. Nachdem letztere getrocknet ist, wird noch einmal Paraffin aufgegeben. Im übrigen dürfte die Art der Anbringung der Definierebene gleichgiltig sein, wenn man nur darauf achtet, dafs deren Querschnitt nicht zu breit im mikroskopischen Bilde erscheint. Auch das Material und die Färbung der Definierebene ist nicht von Bedeutung, nur darf die aufgetragene Farbe sich nicht in Terpentinöl lösen.

Es ist für die Rekonstruktion von grofser Wichtigkeit, dafs man die Schnitte immer in derselben Weise aufklebt und nicht etwa den einen und den andern umkehrt, so dafs rechte und linke Seite vertauscht würden. Im mikroskopischen Bilde sieht man aufser dem Schnitte einen feinen schwarzen oder entsprechend anders gefärbten Streifen, die *Definierebene*.

Jetzt zeichnet man mit dem Zeichenapparate zunächst die Definierebene auf eine Born'sche *Wachsplatte* (dieselben sind bei Grübler käuflich zu haben) und dann die Konturen, event. auch das Detail desjenigen Teiles des Schnittes, den man rekonstruiren will. Je nach der Dicke des Schnittes, der gewählten Vergrörserung und der Beschaffenheit des Materiales entscheidet man sich, den wievielten Schnitt man auf eine zweite, dritte etc. Platte zeichnet, denn es ist nicht unbedingt notwendig, jeden Schnitt abzuzeichnen.

Sind die Zeichnungen beendet, so schneidet man dieselben aus, d. h. man läfst die Konturen stehen und entfernt die Teile aus der Wachsplatte, welche Hohlräumen entsprechen. *Darauf legt man die Definierebenen aufeinander*, prefst die Platten zusammen oder schmilzt sie, indem man sie mit einem erwärmten Spatel überstreicht, auf einander und schneidet das Überflüssige ab. Dann glättet man vorsichtig mit einem erwärmten Spatel die Konturen und kann zur Verschönerung das Ganze mit Farbe überziehen.

Mittels dieser Born'schen *Plattenmodelliermethode* sind ausgezeichnete Resultate erzielt worden.

II. Abschnitt.

Die Anwendung der Methoden.

Vorbemerkung. In den einzelnen Kapiteln dieses Abschnittes soll gezeigt werden, welche von den im I. Abschnitte beschriebenen Methoden für das Studium der Gewebe und Organe des tierischen Körpers sich eignen und welche besonderen Vorsichtsmafsregeln gelegentlich zu beobachten sind. Zugleich sollen hier diejenigen Methoden eine Unterkunft finden, die nur zu speziellen Zwecken für einzelne Organe oder Gewebe angegeben sind und daher füglich im I. Abschnitte nicht gut beschrieben werden konnten. Bei Erwähnung bereits beschriebener Methoden wird nur das Kapitel und die Nummer erwähnt werden, unter welcher dieselben zu suchen sind, und zwar das Kapitel mit römischer, die spezielle Nummer mit arabischer Ziffer. Die Zahlen haben nur auf Abschnitt I Bezug.

Die Einteilung, die ich für die folgenden Erörterungen gewählt habe, schliefst sich eng an die Einteilung in meinem „Grundrifs der Histologie“ (Berlin 1894) an. Nur in zwei Punkten bin ich von derselben abgewichen. Das Nervengewebe behandle ich hier der Bequemlichkeit wegen beim zentralen und peripheren Nervensystem und den Bewegungsapparat behandle ich gar nicht, da die Knochen und Muskeln bei den Geweben erledigt werden.

Aus leicht ersichtlichen Gründen schliefst sich die Darstellung der Histiologie der Vertebraten an; es hat aber im wesentlichen das Gesagte auch Giltigkeit für die Evertebraten. Zur Fixierung von Körpertheilen der *Tracheaten* ist es notwendig, die anzuwendenden Fixierungsmittel heifs, etwa mit einer Temperatur von 70 ° C., einwirken zu lassen.

A. Zelle und Gewebe.

Kap. I. Die Zelle.

a) **Lebende Zellen** zu studieren ist nur möglich bei Protozoën und Leukocyten; wie man die letzteren zur Untersuchung zurichtet, soll beim Kapitel „Blut“ auseinander gesetzt werden, die Untersuchung der Protozoën hat in dem Wasser zu geschehen, in welchem die betreffenden Tiere leben, also in süfsem oder salzigem.

b) **Studium der überlebenden Zellen,** das notwendig ist, einmal um sich über die Form der zelligen Gebilde überhaupt zu unterrichten und dann um festzustellen, ob das, was am fixierten und gefärbten Objekte zu beobachten ist, nicht, wenigstens andeutungsweise, schon am überlebenden, also frischen Materiale erkannt werden kann, geschieht am betsen entweder in der Parenchymflüssigkeit des betreffenden Organes, dessen Zellen das Untersuchungsobjekt abgeben, oder in sogenannter physiologischer Kochsalzlösung (0,5 % bis 0,75 %) oder endlich in Humor aqueus.

Eine Verwendung von *Parenchymflüssigkeit* ist nur möglich bei kompakten Organen, wie Leber, Milz und Speicheldrüsen. Man schneidet z. B. die Leber mit einem scharfen Skalpell an, fährt mit dessen Schneide über die Schnittfläche hin und breitet das, was man auf diese Weise abgestreift, auf einem Objektträger aus. Die Untersuchung, die mit oder ohne Deckglas vorgenommen werden kann, mufs schnell ausgeführt werden, da das Präparat leicht eintrocknet.

Besser ist unstreitig die *physiologische Kochsalzlösung* (0,5 % bis 0,75 %), wenn es mir auch zweifelhaft ist, ob dieselbe wirklich, namentlich wenn es sich um sehr zarte Objekte handelt, durchaus indifferent ist. Man bringt einen Tropfen dieser Lösung auf einen Objektträger, gibt das zu untersuchende Objekt zu und deckt mit einem Deckgläschen ein.

Humor aqueus verschafft man sich in der Art, dafs man die Cornea eines Frosches mit einer Nadel ansticht und die austretende Flüssigkeit auf einem Objektträger auffängt. In derselben werden nach Eindecken mit einem Deckglase die Zellen untersucht. (Parenthetisch sei hier bemerkt, dafs diese Methoden sich auch für Untersuchung frischer Gewebe eignen; cfr. I Nr. 5.)

Unbedingt notwendig ist die Untersuchung frischen Materiales dann, wenn man die Anwesenheit von *Wimperzellen* konstatieren will. Um sich die Bewegung der Wimpern überhaupt vorzuführen, schneidet man mit einer gebogenen Schere ein kleines Stückchen der *Gaumenschleimhaut des Frosches* aus, bringt dasselbe in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung und stellt auf den Rand des Präparates ein. Hier wird sich der Wimperstrom ganz deutlich erkennen lassen. Hat man als Untersuchungsobjekt *marine* Tiere, so mufs man die Konstatierung etwaiger Wimperung in einem Tropfen Seewasser vornehmen.

Zur *Isolation von Epithelzellen* wählt man am besten $^1/_3$ Alkohol, $^1/_4$ Alkohol, dünne Osmiumsäure, Pikrinsäurealkohol oder Jodserum (II 1, 3, 13, 18, 19); für Drüsenzellen ist sehr geeignet Oxalsäure (II 20). Die in den genannten Flüssigkeiten mazerierten Objekte kann man vor dem Zerzupfen färben und bedient sich dazu am besten eines der zur substantiven Färbung geeigneten Alaunhämotoxyline bez. — hämateine (VII 12, 14, 18, 19), welche aber zu diesem Zwecke *sehr stark* mit Wasser verdünnt werden müssen. Auch Vergoldung gibt gelegentlich gute Präparate (VIII 1). Man mufs, will man die Form der Zellen, die bei solchen Methoden das alleinige Studienobjekt bildet, gut erhalten, genau die Regeln beachten, die in den „allgemeinen Bemerkungen“ zu Kap. II des I. Abschnittes auseinandergesetzt wurden; thut man dies nicht, so wird man stets nur Mifserfolge haben.

Zur Darstellung der *Kittsubstanz der Endothelien* ist am besten geeignet die Lösung von salpetersaurem Silber (VIII 9, 10); die Präparate nach VIII 9 können in verdünntem Glycerin, die nach Methode VIII 10 angefertigten in Balsam aufgehoben werden.

c) **Zellteilung.** Die Fixierung der einzelnen Organe ermöglicht das Studium der Struktur der Zellen; für die Kenntnis der mitotischen Zellteilung aber mufs man sich an bestimmte Gebilde halten, die mit Methoden untersucht werden, welche auch für andere Zwecke benutzt werden können, hierfür aber speziell ersonnen und empfohlen sind. Als Objekte sind am geeignetsten die *Hoden* von *Salamandra maculosa* im Juni und Juli, die von *Triton taeniatus* im März, von *Triton cristatus* im

April, ferner die Embryonen und Larven von *Salamandra maculosa* sowie die *Hoden des Flusskrebses* in den Monaten ohne *r*. Bei den Larven des Salamanders kann man die Kiemenplatte wählen oder das parietale Blatt des Peritoneum, findet aber auch in anderen Organen, wenn auch nicht sehr reichlich, Zellteilungsformen. Weniger gut sind die anuren Amphibien. Zellteilungen von Säugetieren studiert man am besten im *Blinddarm des Kaninchens*. Die zelligen Elemente der urodelen Amphibien und der Arthropoden zeichnen sich durch ihre besondere Gröfse aus, zeigen also die Einzelheiten des in den verschiedenen Stadien fixierten Prozesses viel besser, als die kleinen Zellen namentlich der Säugetiere. Sehr wichtig sind auch für das Studium der Zellteilung die sich furchenden Eier der Nematoden, besonders die von *Ascaris megalocephala*. Für das Studium *amitotischer Teilungen* sind am geeignetsten die lymphatische Randschicht der *Leber der urodelen Amphibien* und die *Leukocyten*.

Zur *Fixierung* der *Eier von Ascaris megalocephala* eignet sich am besten Alkohol-Eisessig (III 2) und zur Färbung Boraxkarmin (VII 4) oder Benda's neuere Eisenhämatoxylinmethode (VII 57). Zur Fixierung der übrigen erwähnten Organe kann man verwenden Benda'sche Salpetersäure-Kali bichromicum Methode (III 15), Flemming'sche Lösung (III 21), Chrompikrinsalpetersäure (III 36), Pikrinessigosmiumsäure (III 38), Sublimat (III 39) und Hermann'sche Flüssigkeit (III 50). Letztere, die Flemming'sche Lösung, die Benda'sche Methode und meine Chrompikrinsalpetersäure fixieren sowohl die Zellsubstanz wie die Kerne gut, Pikrinessigosmiumsäure ist sehr geeignet für Kernstrukturen, Sublimat für Zellsubstanzen.

Zur distinkten *Färbung des Chromatins*, also der sogenannten Kernteilungsfiguren, eignen sich vorzüglich die Aniline in substantiver Verwendung, nämlich Fuchsin (VII 21), Safranin (VII 23, 24) und Gentiana (VII 27, 28). Mit Vorteil ist dabei das Gram'sche *Verfahren* (cf. pag. 64) zu verwenden. Vielfach wird in neuerer Zeit auch zur Kernfärbung das *Brasilin* benutzt. Dieser Farbstoff, der wahrscheinlich aus dem Brasilienholz stammt, also pflanzlicher Natur ist, wird genau wie Böhmer'sches Hämatoxylin (VII 12) mit Alaun zubereitet und in der gleichen Weise zum Färben verwandt. Das Brasilin färbt leuchtend rot und sehr scharf und beschränkt sich fast völlig auf das Chromatin. Die gefärbten Teile bleiben auch bei Anwendung stärkster Vergrösserungen scharf begrenzt. Zur Erkenntnis der Strukturen der Zellsubstanz und der Vorgänge bei der Teilung derselben sind zu empfehlen die Doppelfärbungen mit Safranin und Gentiana (VII 47, 48), Safranin-Lichtgrün (VII 49), Flemming's Orangeverfahren (VII 54), das, wenn es gelingt, was nicht immer der Fall ist, ausgezeichnete Bilder liefert, sowie Benda's Kupferhämatoxylin (VII 58). Zur Erkennung der *Attraktionssphäre und des Centrosoma* ist für Präparate, die in Flemming'scher Lösung fixiert waren, nach meinen Erfahrungen am besten die von mir empfohlene adjektive Verwendung der Aniline (VII 62), aufserdem auch Benda's neure Eisenhämatoxylinmethode (VII 57). Weniger empfehlenswert sind für den genannten Zweck die ältere Benda'sche Eisenhämatoxylinmethode (VII 56) und die Modifikation derselben von M. Heidenhain (VII 56[a]), weil der Eisenalaun zu leicht körnige Niederschläge im Präparate bildet.

Zur Darstellung der Altmann'schen *Kern- und Zellsubstanzgranula* bedient man sich, und zwar zur ersteren, der Altmann'schen Kali

bichronicum-Osmiumsäuremischung (III 23), der letzteren der Chromsäure mit molybdänsaurem Ammoniak (III 51).

Zur *Färbung der Kerngranula* verfährt man folgendermafsen: Man bringt die aufgeklebten Schnitte in eine Lösung von 20 gr. Säurefuchsin in 100 ccm. konzentrierten Anilinwassers. (Das Anilinwasser bereitet man nach der auf pag. 65 gegebenen Vorschrift.) Man erwärmt die Deckgläser, welche in einem Uhrschälchen in der Farbflotte sich befinden, oder die Objektträger, wenn man auf diese aufgeklebt hat (in diesem Falle gieſst man die Farbflüssigkeit auf den Objektträger), über einer Spiritusflamme, bis die Flüssigkeit dampft. Dann spült man in Wasser ab und differenziert in folgender Lösung: gesättigte alkoholische Pikrinsäurelösung 1 vol., Aqua destillata 2 vol., und läfst darin solange, bis keine Farbwolken mehr ausgehen. Dann bringt man in absoluten Alkohol, hellt nach dem Entwässern in Xylol auf und montiert in Balsam.

Metzner empfiehlt zur Darstellung der Granula 4 gr. Osmiumsäure in 100 ccm. $1^1/_2$ % Kochsalzlösung zu lösen und daraus sich Mischungen mit Chromsäure oder deren Salzen herzustellen. Ich habe die Überzeugung, dafs so starke Lösungen der Osmiumsäure das Kerngerüst zertrümmern.

Als *Regel für die Fixierung* von Salamander- bez. Tritonhoden ist festzuhalten, dafs ein Zerschneiden der Organe vor dem Einbringen in die Fixierungsflüssigkeit nicht vorzunehmen ist, da dieselben hinreichend klein sind und durch das Anschneiden leicht Zerrungen entstehen können. Die Hoden des Flufskrebses dagegen müssen vor dem Fixieren zerschnitten werden, weil sie zu voluminös sind. Man sei aber bei diesem Objekte auf Mifserfolge gefafst; woran es bei diesem Tiere liegt, vermag ich nicht zu sagen, nicht blofs beim Hoden, sondern auch bei den übrigen Organen erhält man, welche Fixierungsflüssigkeit man auch anwenden möge, unter anscheinend ganz gleichen Bedingungen ganz verschiedenartige Resultate. Das eine Mal ist die Fixierung sehr gut geworden, das andere Mal ist sie total mifslungen. Am relativ sichersten, aber eben auch *nur relativ*, wirkt Flemming'sche Lösung.

Kap. II. Bindesubstanzen.

α) Bindegewebe sensu strictiori.

a) Das **ungeformte oder lockere Bindegewebe** (*areoläres Bindegewebe*) studiert man am besten am *Omentum majus* eines Säugetieres. Man schneidet ein Stückchen mit der Schere ab und untersucht in physiologischer Kochsalzlösung. Oder man führt sofort in ein stark verdünntes Alaunhämatoxylin bez. -hämatein über (VII, 12, 14, 19), in welchem die Netzstücke bleiben, bis sie blau gefärbt sind, wäscht dann in *gewöhnlichem Wasser* aus, in dem die Bläuung noch intensiver wird, und hebt in Glycerin auf (IX 1). Die Fibrillen treten hierin sehr schön hervor. Zur Darstellung der die Bindegewebsfibrillen umgebenden Endothelien eignet sich besonders die Deckhuyzen'sche Silbermethode (VIII, 10).

Für die Untersuchung des *elastischen Gewebes* ist am besten das *Ligamentum nuchae der Wiederkäuer*; man zerzupft dasselbe, was sehr

schwer auszuführen ist, in Wasser und setzt seitlich etwas 1% Essigsäure zu. Die elastischen Fasern sind an ihrem geschlängelten Verlaufe leicht kenntlich.

Sehr interessant und wichtig ist das — zur Zeit noch viel zu wenig gepflegte — Studium des *interstitiellen Bindegewebes der Evertebraten*. Man fixiert nach der Angabe von Brock Organe von Gastropoden in Sublimatlösung (III, 39), härtet sie dann in Alkohol und präpariert die zwischen den Teilen des Organes sich ausspannenden Bindegewebsplättchen mittels Schere und Pinzette vorsichtig heraus. Diese Plättchen breitet man auf einem Objektträger sorgfältig aus, läfst den Alkohol gröfstenteils verdunsten, wodurch die Plättchen ankleben, und übergiefst mit einem starken Alaunhämatoxylin (VII 12, 14, 19). Nach der Färbung wird ausgewaschen, entwässert und in Kanadabalsam oder Dammarlack eingeschlossen (IX 13, 14). Auf's schönste treten jetzt die Flemming'schen Schleimzellen (Langer'sche Blasen) hervor. Will man die Organe schneiden und auf Schnitten das interstitielle Gewebe untersuchen, so fixiert man in Pikrinsalpetersäure (III 35) — dieses Reagens ist für *Mollusken* nach meinen Erfahrungen das beste — und färbt die Schnitte nach meiner Orange-Hämateinmethode (VII 44).

b) **Geformtes Bindegewebe** kommt in den Fascien, Aponeurosen, Sehnen, der Dura mater, der Cornea und der Sclera vor. Um seine fibrilläre Zusammensetzung zu erkennen, behandelt man frische Sehnen mit Barytwasser (nach Rollett), in welchem die Fibrillen deutlich hervortreten.

Die zelligen Elemente dieser Gewebsart studiert man an den *Sehnen kleiner Säugetiere*, z. B. der Schwanzsehnen der Maus, oder *an der Cornea* vom Frosch oder von einen kleinem Säugetiere. Die Cornea vergoldet man (VIII 1, 4, 7), entfernt durch Abpinseln das Hornhautepithel und breitet kleine Stückchen des vergoldeten Gewebes, das bei gelungener Reduktion einen hochroten Farbenton haben mufs, auf dem Objektträger aus, schliefst in Glycerin ein (IX 1) und umrandet (IX 3—6). Die sternförmigen Zellen treten in guten Präparaten prächtig hervor.

Die *Sehne* eines Säugetieres oder eines Frosches legt man frisch in Alaunhämatoxylin bez. -hämatein (VII 12, 14, 19) oder in Alaunkarmin (VII 6) oder Karmalaun (VII 9a), wäscht beim Hämatoxylin nach ½ Stunde, beim Karmin nach 2—3 Stunden gut in Wasser aus und zerzupft in einem Tropfen Glycerin. Die Präparate halten sich viele Jahre.

β) Fettgewebe.

Das *Fettgewebe* trifft man häufig in Gemeinschaft mit dem areolären Gewebe. Die Fettzellen sind durch ihre kugelrunde Gestalt und durch ihr starkes Lichtbrechungsvermögen leicht kenntlich. Den in jeder von ihnen vorhandenen Kern macht man durch Alaunhämatoxylin (VII 12, 14, 19) oder Alaunkarmin (VII 6, 9a) deutlich. Das Fett selber wird durch Osmiumsäure geschwärzt und dadurch sichtbar gemacht, während es bei anderen Fixierungsmitteln unkenntlich bleibt und durch den zum Härten verwendeten Alkohol gelöst werden kann. Man bedient sich entweder der reinen Osmiumsäure in 1% Lösung (III 16) oder eines osmiumhaltigen Gemisches, z. B. der Flemming'schen Lösung oder meiner Pikrinosmiumsalpetersäure (III 21, 37) und kann zur

gründlichen Schwärzung mit Holzessig oder Tannin nachbehandeln (III 26, 28). Will man osmiertes Fett in Paraffin einbetten und schneiden, so darf man nach dem Entwässern *nur Chloroform* verwenden, da Terpentin oder Xylol wieder lösend wirken.

γ) Schleimgewebe.

Das *Schleimgewebe der Säugetiere* untersucht man am vorteilhaftesten am *Nabelstrang von neugeborenen Individuen* oder *von Embryonen*, oder am *Glaskörper von Säugetierembryonen*. Man fixiert in Chromsäure, Flemming'scher Lösung, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 3, 21, 35, 36, 39) und färbt die von paraffiniertem Materiale angefertigten Schnitte am besten in einer Doppelfärbung: Karmin-Hämatoxylin, Pikrokarmin, Eosin-Hämatein oder Orange-Hämatein (VII 33, 36, 43, 44).

δ) Retikuläre Bindesubstanz.

Die retikuläre Bindesubstanz wird an den *lymphoiden Organen* (Lymphknoten, Milz, Thymus) studiert. Man macht von den irgendwie fixierten und gehärteten Organen auf feuchtem Wege nicht zu dünne Schnitte, die man auspinselt (II 29) odert schüttelt (II 30). So werden alle Zellen oder fast alle aus den Maschen des Gewebes entfernt und dieses kann darauf in irgend einer Weise gefärbt werden. Aufgehoben wird am besten in Glycerin (IX 1) oder Kali aceticum (IX 2), während die Anwendung von Kanada sich hier nicht empfiehlt, weil die Schnitte, wenn sie aus dem Alkohol in das aufhellende Öl gebracht werden, infolge der starken Diffusionsströmungen zerreifsen.

Die zweite Art des retikulären Gewebes, die *Neuroglia*, deren Zugehörigkeit zu den Bindesubstanzen sehr fraglich ist, soll beim Zentralnervensystem besprochen werden.

ε) Knorpelgewebe.

Man unterscheidet bekanntlich drei Formen des Knorpelgewebes, den hyalinen Knorpel, den elastischen oder Netzknorpel und den Faser- oder Bindegewebsknorpel.

a) Der **hyaline Knorpel** hat eine solche Festigkeit, dafs man vom frischen Materiale mit einem feinen Rasiermesser aus freier Hand hinreichend dünne Schnitte anfertigen kann. Dieselben können in physiologischer Kochsalzlösung untersucht werden, in welcher man sehr gut die Zellen in der Grundsubstanz erkennt. Man kann aber auch einen solchen Schnitt in Lügol'scher Lösung, wie sie beim Gram'schen Verfahren benutzt wird (Jod 1,0, Jodkalium 2,0, Aqua destillata 300 ccm.) färben, in welcher die Knorpelkapseln und die Kerne sich scharf voneinander abheben. Hämatoxylin (VII 12, 14, 19) färbt die Knorpelgrundsubstanz intensiv veilchenblau, die Kerne blau und läfst die Zellsubstanz ungefärbt. Letztere tritt nach Doppelfärbungen gut hervor und zwar eignen sich am besten dazu Eosin-Hämatein und Orange-Hämatein (VII 43, 44). In dem Ehrlich-Biondi'schen Farbengemisch (VII 51) wird die Knorpelgrundsubstanz leuchtend grün. Will man *Chondrinballen* und *Balkennetz* besonders gefärbt darstellen, so kann man nach der folgenden Wolters'schen *Methode* verfahren. Frische oder

von einem in 90 % Alkohol konservierten Materiale angefertigte Schnitte kommen in eine 1 % Lösung von β Naphtholorange (nach Wolters Tropaeolin OOO Nr. 2) für $^1/_2$ Stunde, werden dann 3 Minuten in Wasser gewaschen und auf 1—2 Minuten in eine 0,15 % wässrige Methylviolettlösung übergeführt. Dann werden sie in Wasser abgespült, einige Minuten in 10 % Essigsäure entfärbt und direkt in absoluten Alkohol übertragen. Hier tritt die Differenzierung ein; dann wird montiert. Besonders für Rippenknorpel geeignet; *die Chondrinballen sind prachtvoll blau auf gelbem Grunde.*

Die *Patella der höheren Säuger* besitzt anastomosierende Knorpelzellen; die Anastomosen sind der Ausdruck eines *Saftlückensystemes.* Will man dieses an anderen hyalinen Knorpeln zur Anschauung bringen, so mufs man die Schnitte mehrere Tage mit Schwefeläther behandeln.

Organe, welche hyalinen Knorpel enthalten, durchtränken sich sehr schwer mit Paraffin; man mufs daher sehr lange in Chloroform lassen, bis zu 8 Tagen und darüber, will man brauchbare Schnitte erhalten.

b) **Elastischer- oder Netzknorpel,** der sich in der *Ohrmuschel,* der *Epiglottis,* den Santorini'schen, Wrisberg'schen und zum Teil auch in den *Aryknorpeln* findet, wird am besten an fixiertem Materiale untersucht. Zum Fixieren eignen sich 1 % Chromsäure, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure (III 3, 35, 26). Man durchtränkt entweder in Celloidin oder schmilzt in Paraffin ein und färbt die Schnitte mit Alaunkarmin (VII 6, 9a), Alaunhämatoxylin (VII 12, 14, 19), Eosin-Hämatein, Orange-Hämatein (VII 43, 44) oder Orange-Alaunkarmin (VII 40). Auch eine Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Säurefuchsin gewährt gute Bilder. Man färbt zunächst in Hämatoxylin, und zwar natürlich substantiv, wäscht gut aus und bringt für höchstens $^1/_2$ Stunde in 1 % Säurefuchsin. Dann wird ausgewaschen, gut entwässert, bis keine Farbwolken mehr ausgehen, und in Kanadabalsam aufgehoben.

c) **Faser- oder Bindegewebsknorpel,** der sich in den *Augenlidern der Säuger, in den Menisken und den Labra cartilaginea der Gelenke* und *in den Zwischenwirbelscheiben* findet, ist gleichfalls am fixierten Materiale zu untersuchen. Zu empfehlen sind als Fixierungsflüssigkeiten Alkohol absolutus, Kleinenberg'sche Flüssigkeit, Pikrinsalpetersäure (III 1, 32, 35) und zur Färbung der entweder freihändig oder nach Celloidineinbettung angefertigten Schnitte Orange-Alaunkarmin, Eosin-Hämatoxylin, Orange-Hämatein oder Safranin-Gentiana nach Flemming (VII 40, 43, 44, 47). Vielleicht eignet sich für das Studium dieser Knorpelart, sowie der beiden vorigen die adjektive Verwendung der Aniline (VII 62).

ζ) Knochengewebe.

Die Struktur des Knochengewebes kann man entweder an dem von seinen Kalksalzen befreiten, also entkalkten, Knochen untersuchen oder an dem die Kalksalze noch enthaltenden. Den entkalkten Knochen, den sogenannten *Knochenknorpel,* zerlegt man in *Schnitte,* von dem nicht entkalkten Knochen fertigt man *Schliffe* an.

a) *Einen* **Knochenschliff** macht man auf folgende Weise: Man sägt von einem mazerierten oder frischen *Röhrenknochen eines Säugetieres*, z. B. eines Hundes oder Rindes, mit einer feinen Bogensäge ein möglichst dünnes Stück entweder — je nach dem gewünschten Bilde — in der Längsachse oder in der Querachse ab. Ich pflege mir die Präparate nun so herzustellen, dafs ich diesen Sägeschnitt auf *feinstem Schmirgelpapier* schleife, indem ich ihn so lange mit dem Zeigefinger auf dem Papier reibe, bis er so dünn geworden ist, dafs es sich wie Papier biegt und dafs man die Leisten der Fingerbeere bei leichtem Andrücken durch den Schliff erkennen kann. Während des Schleifens drehe ich den Sägeschnitt von Zeit zu Zeit um, damit beide Flächen mit dem Schmirgelpapier in Berührung kommen. Ein Nachteil dieses Verfahrens dürfte für Manchen darin bestehen, dafs die Haut des Fingers vom Schmirgelpapier stark angegriffen wird. Man kann dem entgehen, indem man den Sägeschnitt auf einen *Kork* mit Gummiarabicumlösung aufgeklebt und nach dem Antrocknen den Sägeschnitt auf Schmirgelpapier oder auf einem gewöhnlichen Schleifsteine so lange schleift, bis man den Kork durchschimmern sieht. Man hält hierbei den Kork mit dem Daumen und Zeigefinger der rechten Hand. Dann bringt man den Kork mit dem aufgeklebten Schliff in Wasser, in welchem der Schliff sich loslöst, wäscht letzteren sorgfältig ab, reinigt ihn mit einem Haarpinsel sorgfältig von etwa ihm anhaftenden Korkpartikeln, trocknet ab und hebt auf. Knochenschliffe, die auf eine der genannten Weisen angefertigt wurden, hebt man in *dickem* Terpentin- oder Xylolkanadabalsam auf (IX 13).

Will man *Knochenschliffe färben*, so kann man nach Zimmermann folgendermafsen verfahren. Schliffe von mazeriertem Knochen werden in Xylol gekocht und gut getrocknet. Dann werden sie in ein Uhrschälchen übergeführt, in welchem sich gesättigte alkoholische Fuchsinlösung (VII 21) befindet. Hierin werden sie mehrmals 2 Minuten lang gekocht — vielleicht am besten auf dem Sandbade — und dann abkühlen gelassen. Der Schliff wird dann mit viel anhaftender Farbstofflösung auf die Branchen einer Pinzette gelegt, so dafs er also hohl liegt. Nach 3 Tagen ist er getrocknet und nun wird der überschüssige Farbstoff grob mit einem Skalpell abgeschabt. Den Rest entfernt man, indem man in Xylol auf einem Schleifstein mittels des Fingers schleift, dann pinselt man in Xylol ab und legt in Xylolbalsam ein. Ehe man das Deckglas auflegt, wird das Präparat im Balsam auf dem Objektträger etwas erhitzt.

Statt des Fuchsins kann man sich auch einer alkoholischen Safranin- oder Gentianaviolettlösung bedienen.

Um die Sharpey'schen Fasern deutlich zu erkennen, empfiehlt Kölliker den feinen Schliff in einen rotglühenden Platintiegel — eventuell kann man auch einen kleinen Porzellantiegel nehmen und bis zum Rotglühen erhitzen — zu bringen und $^1/_2$—1 Minute zu glühen. Bei zu langem Glühen werden die Schliffe schlecht und unbrauchbar. Den geglühten Schliff kann man nach dem Erkalten auf die gewöhnliche Weise untersuchen.

Zur Untersuchung der Knochenkörperchen, die zu isolieren keinen rechten Sinn hat, nimmt man aus der Epiphyse eines frischen Röhrenknochens ein Knochenbälkchen mit der Pinzette und vergoldet dasselbe nach der Cohnheim'schen Methode (VIII 1); mazerierte Knochen

dürfen nicht genommen werden. Nach der Reduktion hebt man in Glycerin auf, doch sind die Präparate nicht lange haltbar.

b) Um **Knochenschnitte** anzufertigen ist es nötig, den Knochen vorher zu entkalken, in sogenannten *Knochenknorpel* zu verwandeln. Vor der Entkalkung aber mufs man fixieren, wenn nicht die Fixierungsflüssigkeit gleichzeitig als Entkalkungsmittel dient. In beiden Richtungen wirksam sind die reine Pikrinsäure, die Pikrinsalpetersäure und die Burckhardt'sche Chromosmiumsalpetersäure (III 29, 35, 22). Schwefelsäurehaltige Flüssigkeiten dürfen nicht genommen werden, da sie unlösliche Gipsniederschläge hervorrufen. Sonst eignen sich zur Fixierung des Knochens Chromosmiumsäure (IV 19, 20), und Chrompikrinsäure (III 33, 34). Da die Knochensubstanz sich schwer durchtränkt, so wird man gut thun, das zu fixierende Stück mehrere Tage in der öfter zu wechselnden und in reichlicher Menge vorhandenen Fixierungsflüssigkeit zu lassen. Nach dem Fixieren und Erhärten wird entkalkt. Die vorhin erwähnte Pikrinsäure und Pikrinsalpetersäure entkalken sehr langsam, ebenso wirkt langsam die Chlorpalladiumsalzsäure (IV 3), während die übrigen in Kap. IV unter a angegebenen Methoden schneller den Effekt herbeiführen. Es ist jede derselben zum Entkalken von Knochengewebe geeignet; auf die zu beachtenden Kautelen ist in dem betreffenden Kapitel hingewiesen. Die Zeit der Vollendung der Entkalkung ist eine verschiedene. Entkalkten und nach dem Entkalken wieder gehärteten Knochen kann man aus freier Hand oder nach Celloidineinbettung schneiden. Zur Einschmelzung in Paraffin würde ich, solange es sich nur um den Knochen, nicht aber um etwaige in Knochenkapseln eingeschlossene Organe handelt, nicht raten. Der Knochen durchtränkt sich aufserordentlich schwer und schneidet sich nicht gut. Zur Färbung eignen sich am besten Doppelfärbungen, und zwar Indigkarmin-Boraxkarmin (VII 34) und Orange G-Hämatein (VII 44); auch Pikrokarmin (VII 35, 36) kann gute Resultate geben.

c) **Knochenmark.** Um das Knochenmark der histiologischen Untersuchung zugänglich zu machen, mufs man die Knochensubstanz zersprengen. Man spannt zu dem Zwecke den Röhrenknochen in einen Schraubstock und dreht letzteren so lange zu, bis die Tela ossea springt. Dann schneidet man ein Stück des Knochenmarkes heraus und fixiert. Will man die Zellen der Medulla ossium studieren, ohne vom Fett belästigt zu werden, so nehme man die Benda'sche Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode oder Pikrinsalpetersäure oder Chrompikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 15, 35, 36, 39), bette in Paraffin ein und färbe mit Eosin-Hämatoxylin oder dem Ehrlich-Biondi'schen Gemisch oder Ehrlich's Triacidgemisch (VII 43, 51, 52) oder verwende einen Eisenhämatoxylinlack, am besten den neueren Benda'schen Lack (VII 57). Will man aber den Fettgehalt des Markes mit zur Anschauung bringen, so wähle man zur Fixierung ein Osmiumsäure enthaltendes Gemisch, etwa Chromosmiumsäure oder Flemming'sche Lösung (III 19, 20, 21) und färbe substantiv mit Fuchsin oder Babes'schem Safranin (VII 21, 24).

Zuweilen dürfte es notwendig sein, den *Knochen und das Knochenmark zusammen zu behalten.* Hierfür eignet sich die von v. Koch für Korallenstudien gebrauchte Methodik. Man sprengt zunächst die Knochensubstanz, fixiert dann das ganze Stück in einer der vorhin

erwähnten Flüssigkeiten, härtet und nimmt zunächst Stückfärbung vor. Man wählt alkoholisches Boraxkarmin oder Alauncochenille (VII 4, 11). Dann wird entwässert, gehörig mit Chloroform durchtränkt und in Chloroformkanadabalsam eingebracht. Jetzt erwärmt man langsam den das Stück enthaltenden Balsam, infolge wovon das Chloroform verdunstet; die Temperatur kann auf 50 ° C. allmählig gesteigert werden. Bis zum völligen Hartwerden des Balsams dauert es mehrere Monate, dann aber haben die Objekte eine Härte, dafs man sie zersägen und von ihnen feine Schliffe anfertigen kann.

Will man Knochen und Knochenmark im Zusammenhang *schneiden*, dann mufs man nach dem Fixieren und Erhärten entkalken und man verfährt dann so, wie beim Schneiden von Knochen allein.

d) **Knochenentwickelung.** Man fixiert die *Röhrenknochen von Embryonen*, um die *Verknöcherung* zu studieren, nach der Benda'schen Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode oder in Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure, Sublimat, Chromessigsäure oder einfacher Chromsäure (III 15, 35, 36, 39, 5, 3). Am besten dürften die Benda'sche Methode und die Chrompikrinsalpetersäure sein. Ist der Knochen schon kalkhaltig, so mufs selbstverständlich vor dem Einbetten in Celloidin oder Paraffin entkalkt werden. Gefärbt wird mit Hämatoxylin-Karmin nach Strelzoff (VII 32) oder mit Indigkarmin-Boraxkarmin (VII 34) oder Eosin-Hämatoxylin oder Orange-Hämatein (VII 42, 43, 44). Aufgehoben werden die Präparate in Kanadabalsam oder venetianischem Terpentin.

η) Zahngewebe.

Zur Anfertigung von Zahnschliffen, von Zahnschnitten, zum Studium der Weichteile des Zahns (Pulpa) und zum Studium der Zahnentwickelung verfährt man *genau so wie beim Knochengewebe;* das dort Gesagte findet hier sinngemäfse, meistens buchstäbliche Anwendung. Nur ist zu beachten, dafs der Zahn viel härter ist als der Knochen, dafs also z. B. die Entkalkung viel länger dauert. Zur Isolation der *Schmelzprismen* empfiehlt sich ein Mazerieren in konzentrierter *Ameisensäure;* man mufs durch wiederholtes Prüfen feststellen, wann der zum Zerzupfen geeignete Mazerationsgrad erreicht ist, zerzupft dann in Wasser oder färbt erst, nach *sorgfältigem Auswaschen*, in ammoniakalischem Karmin (VII 1) und zerzupft in Glycerin oder Kali aceticum (IX 1, 2).

Kap. III. Muskelgewebe.

a) **Quergestreifte Muskeln.** Zur *frischen Untersuchung* wählt man ein kleines Stückchen, das mit einer auf die Fläche gebogenen Schere abgeschnitten wird, eines Extremitätenmuskels vom *Frosch*, der *Eidechse*, vom *Flusskrebs* oder von einem *Käfer* (z. B. Dytiscus marginalis) und zerzupft sorgfältig in physiologischer Kochsalzlösung. Hierin erkennt man die Querstreifung sehr deutlich und kann auch einige Details beobachten. Will man die *Muskelkörperchen* zur Anschauung bringen, so setze man dem Präparate, das man in der Kochsalzlösung untersucht, etwas 0,1 % Essigsäure zu. Es geschieht dies in der Weise, dafs man einen Tropfen der Säure mit einem Glasstäbchen oder einer

Pipette seitlich an den Rand des Deckglases bringt, wobei man sich davor zu hüten hat, das Deckglas selbst zu befeuchten. Dann lege man an den entgegengesetzten Rand des Deckglases ein Stückchen Filtrierpapier, um die Kochsalzlösung abzusaugen, und beobachte den Vorgang der Verdrängung der einen Flüssigkeit durch die andere unter dem Mikroskope. Von Zeit zu Zeit muſs das Stückchen Filtrierpapier erneuert werden, wenn sich das erste vollgesogen hat, und muſs etwas Essigsäure frisch zugesetzt werden, wenn die Flüssigkeit unter dem Deckglase zu schwinden beginnt. Treten die Muskelkörperchen deutlich hervor, dann ist das Fliefspapier zu entfernen und mit dem Säurezusatz aufzuhören. Zum Studium der Muskeln von *Säugetieren* sind am geeignetsten die des *Schweines;* im übrigen können selbstverständlich die Muskeln *aller* Spezies Objekt der Untersuchung werden, nur muſs man sich darüber klar sein, daſs nicht bei allen die in den Lehrbüchern der Histiologie geschilderten Details in gleicher Deutlichkeit wie bei den paradigmatischen Arten zu sehen sind. — Präparate, die nach vorstehenden Angaben gemacht wurden, lassen sich natürlich nicht aufheben.

Die quergestreifte Muskelfaser besteht bekanntlich aus *Fibrillen,* ist ein *Fibrillenbündel;* im Innern des Bündels zeigt sich die besondere, von Cohnheim entdeckte Spezialgruppierung der Fibrillen zu den *Muskelsäulchen* oder *Primitivcylindern. Um letztere darstellen zu können,* muſs man den Muskel gefrieren lassen und dann mit dem Gefriermikrotom (VI 4 ε) *feine Querschnitte* von ihm anfertigen. Die letzteren beobachtet man frisch oder nach vorheriger Vergoldung (VIII 1, 3).

Den *Fibrillenzerfall* sieht man am deutlichsten an Zupfpräparaten von Muskeln, welche mehrere Monate in $^1/_3$ Alkohol oder $^1/_4$ Alkohol (II 1, 3) gelegen haben. Man kann solche Präparate in Indigkarmin-Boraxkarmin (VII 34) färben und nach der Differenzierung in Glycerin oder Kali aceticum (IX 1, 2) zerzupfen und aufheben. Um *schnell* einen Zerfall in die Fibrillen herbeizuführen, sind die Methoden von Kühne — chlorsaures Kali mit Salpetersäure (II 25) — und Sandmann — schwefelige Säure (II 27) — sehr geeignet. Bei letzterer Methode ist eine Vergoldung leicht auszuführen (II 27) und die so erhaltenen Präparate sind daher der Aufbewahrung fähig, während die Kühne'sche Methode keine Dauerpräparate gestattet.

Den *Zerfall der Muskeln in Querscheiben — Discs —* erreicht man durch ein mehrtägiges Einlegen in 0,5 %—1 % Essigsäure oder, noch besser, durch Mazeration in 0,5 %, 0,1 % oder 0,05 % Salzsäure. Bei Anwendung des letzteren Reagens bringt man den in kleine Stückchen zerschnittenen Muskel in ein Becherglas mit der Säure — die Quantität der letzteren muſs mindestens das 30fache des Volumens des Muskels betragen — und hängt dasselbe in ein Wasserbad, dessen Temperatur während 24 Stunden konstant auf 30—37° C. erhalten wird. Dann zerzupft man nach Auswaschen in einem Tropfen Wasser; die Präparate sind nicht haltbar.

Die *Querscheiben,* aus deren Aneinanderreihung in der Längsaxe die Fibrillen zustande kommen, zeigen eine ungemein diffizile Struktur. Um diese deutlich wahrnehmen zu können, bringt man *Larven von Käfern* nach dem Vorschlage von Rollett auf 24 Stunden und länger in toto in 93 % Alkohol. Dann schneidet man ein Stückchen von einem Muskel mit einer feinen, gebogenen Schere heraus und vergoldet dasselbe nach Cohnheim, Löwitt oder Golgi (VIII 1, 3, 7) oder färbt

mit einem sehr verdünnten Alaumhämatoxylin (VII 12, 14, 19). Bei der Vergoldung kann man mit Vorteil bei der Cohnheim'schen bez. Löwitt'schen Methode (VIII 1, 3) auch das Goldchloridkalium anwenden. Solche Präparate können in Glycerin aufbewahrt werden und halten sich lange, wenn man sie nur genügend vor Licht geschützt hat.

Die *optischen Eigenschaften* der Querscheiben sind, wie in den Lehrbüchern der Histiologie ausführlich zu lesen, sehr eigenartige; man erkennt dieselben im *polarisierten Lichte*. Über die Wirkung der Polarisationseinrichtungen und deren Benutzung beim Mikroskopieren informiert man sich am besten in dem ganz vortrefflichen Werkchen von Ambronn: „Anleitung zur Benutzung des Polarisationsmikroskops bei histologischen Untersuchungen" (Leipzig, Robolsky).

Wenn man *Organe, welche quergestreifte Muskeln enthalten,* fixieren will, um die Muskeln an Schnittpräparaten zu studieren, so wählt am besten Chromsäure, Chromessigsäure, Flemming'sche Lösung, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure oder Palladiumchlorür (III 3, 5, 21, 35, 36, 47). Die Organe müssen sorgfältig vor dem Einschmelzen entwässert werden und müssen sehr lange in Chloroform liegen (6—8 Tage), da die Muskeln sich nur schwer mit Paraffin durchtränken. Zur *Färbung* halte ich nur die folgenden drei Methoden für geeignet: Alaunkarmin bez. Karmalaun (VII 6, 9a), Orange G-Hämatein (VII 44) und Boraxkarmin-Indigkarmin (VII 34). In Alaunkarmin wird die quergestreifte Substanz rötlich, die Kerne färben sich intensiver rot mit einem Stich ins Violette; in Orange G-Hämatein nehmen die Muskelfasern einen orangenen Farbenton an, während die Kerne blau werden, und in Boraxkarmin-Indigkarmin ist die Muskelsubstanz leuchtend blaugrün, die Kerne sind tiefrot. In allen drei Färbungsmitteln ist, namentlich nach vorhergegangener Fixierung in Pikrinsalpetersäure oder Chrompikrinsalpetersäure, das histiologische Detail der quergestreiften Substanz deutlich zu erkennen. Die Präparate können in venetianischem Terpentin oder Kanadabalsam (IX 7, 13) aufgehoben werden und behalten die Farbe jahrelang in fast unveränderter Frische; allmählich blassen sie allerdings ab.

b) **Glatte Muskeln.** Am geeignetsten ist für das Studium der glatten Muskulatur die *Harnblase des Frosches*. Man breitet dieselbe auf einem Objektträger so aus, dafs sie glatt liegt und die Epithelschicht nach oben sieht. Dann entfernt man zunächst durch Pinseln die Epitheldecke (II 29), indem man mit einem in 0,75 % Kochsalzlösung getauchten feinen Haarpinsel längere Zeit über die Oberfläche hinfährt. Die Ablösung des Epithels gibt sich durch eine Trübung der aus dem Pinsel auf das Präparat gebrachten Flüssigkeit kund; man pinselt nun so lange, bis keine Trübung mehr auftritt, gibt dann einen Tropfen reiner physiologischer Kochsalzlösung zu, deckt mit einem Deckglase ein und untersucht. Will man ein solches Präparat färben, so wählt man eine Vergoldungsmethode, mufs aber *vorher* in destilliertem Wasser schnell aber gründlich abspülen. Man erreicht dies, indem man die Blase mit einer Pinzette fafst und in sehr viel destilliertem Wasser schnell hin und her bewegt. Zur Vergoldung eignen sich die Cohnheim'sche, Löwitt'sche und Golgi'sche Methode (VIII 1, 3, 7). Beim Einbringen des vergoldeten Präparates in Glycerin hat man *sorgfältig* darauf zu achten, dafs die *Innenfläche* der Blase nach oben kommt, dafs

diese also direkt unter dem Deckglase liegt; das Präparat wird so leichter verständlich.

Statt das Epithel abzupinseln, kann man dasselbe nach der Klebs'schen Rohrzucker — schweflige Säure Methode entfernen (II 26); man spült nach Ablösung des Epithels in destilliertem Wasser ab und vergoldet nach einer der vorhin erwähnten Vorschriften.

Zur Isolation des Epithels des Darmkanales von der Muskelhaut ist sehr geeignet die Hopkin'sche Salpetersäure — Alaun-Methode (II 24). Man breitet die Muskelhaut flach auf dem Objektträger aus und untersucht in 0,75 % Kochsalzlösung. Damit die Haut nicht zu dick ist, mufs man kleine, sehr fettarme Säugetiere wählen und sich hier die dünnsten Stellen des Dünndarms aussuchen. Am besten dürften *weisse Mäuse* sein.

Will man die *glatten Muskelfasern der Organe* auf Schnitten untersuchen, so fixiert man wie bei der quergestreiften Substanz. Zur Färbung nach Fixierung in Flemming'scher Lösung dürften Fuchsin oder Safranin (VII 21, 23), nach Pikrinsalpetersäure etc. Boraxkarmin-Indigkarmin (VII 34) am besten sein. Namentlich mit letzterer Farbstoffkombination erhält man ganz ausgezeichnete Resultate.

Über die Nervenendigungen der Muskeln soll beim *peripheren Nervensystem* das Nötige gesagt werden.

Kap. IV. Blut.

Die *Bewegung des lebendigen Blutes*, den *Kreislauf*, kann man an der *Schwimmhaut*, der *Zunge*, dem *Mesenterium* und der *Lunge des Frosches* in ganz ausgezeichneter Weise untersuchen (I 1—4). Die Methode der Herrichtung der genannten Organe findet man in Kap. I Abschnitt I ausführlich beschrieben.

Zur *frischen Untersuchung* dient ein dem *eignen Finger* oder ein aus der Haut oder der Ader eines Tieres entnommener Tropfen. Derselbe darf nicht zu grofs sein, sonst sieht man infolge der Massenhaftigkeit der roten Blutkörperchen gar nichts.

Zur Zählung der im Kubikmillimeter Blut vorhandenen *roten und farblosen Blutkörperchen* bedient man sich des Thoma-Zeiss'schen Zählapparates. Man saugt in die bei dem Apparate vorhandene Pipette Blut bis zu einer bestimmten Marke und zieht dann, ebenfalls bis zu einer Marke, 3 % Kochsalzlösung nach. Diese gut durchgemischte Flüssigkeit wird in die sogenannte Zählkammer gebracht und unter dem Mikroskope gezählt. Hat man die Kochsalzlösung mit etwas dünner Gentianaviolettlösung gefärbt, so erscheinen in der Zählkammer die farblosen Blutzellen bläulich tingiert und sind daher leicht von den roten Blutkörperchen zu unterscheiden. Übrigens ist jedem solchen Apparate eine genaue Beschreibung beigegeben, nach welcher es leicht ist, die Zählung auszuführen.

Um *Dauerpräparate* von Blut herzustellen, verfährt man nach Ehrlich folgendermafsen. Man bringt einen kleinen Tropfen Blut auf ein Deckglas, legt schnell ein zweites Deckglas auf, sodafs sich der Tropfen in kapillarer Schicht ausbreitet, und zieht die Deckgläser auseinander. Man läfst sie zunächst lufttrocken werden, indem man sie, mit der Blutschicht nach oben, an einen staubfreien Ort hinlegt. Dann werden sie bei 120° C. gedörrt, was am besten auf einem Sandbade

geschieht. Nach dem Erkalten können sie gefärbt werden. Am geeignetsten dazu ist Eosin-Hämatoxylin. Man löst in 100 ccm. Ehrlich'schem Hämatoxylin (VII 15) 1 gr. Eosin und läfst die Mischung 3 Wochen im Licht stehen. Beim Gebrauche gieſst man einen Tropfen der Farbflüssigkeit auf die Blutseite des Deckglastrockenpräparates, spült nach 2 Stunden in gewöhnlichem Wasser — am besten unter der Wasserleitung — sorgfältig ab, trocknet gut zwischen zwei Filtrierpapierblättern uud hebt in Kanadabalsam auf. Resultat: rote Blutkörperchen leuchtend rot, farblose blau gefärbt. In letzteren sind gewisse Granulationen rot gefärbt; über diese „eosinophilen" Granulationen siehe später.

Auch das Ehrlich-Biondi'sche Dreifarbengemisch, sowie Ehrlich's Triacidgemisch (VII 51, 52) sind zum Färben solcher Deckglastrockenpräparate geeignet. Man bringt einen Tropfen Farblösung auf das Deckglas, spült nach 2—24 Stunden Färbung in Wasser, zieht in Alkohol aus, bis keine Farbwolken mehr ausgehen, und montiert in der üblichen Weise.

Zur *Fixierung des Blutes* kann man in folgender Weise verfahren: Man nimmt eine gewöhnliche Impflanzette, sterilisiert deren Spitze durch Glühen in einer Gasflamme, taucht sie nach dem Erkalten in Flemming'sche Lösung und sticht nun vorsichtig in den eignen Finger. Der hervortretende Blutstropfen kommt mit dem Tropfen der Flemming'schen Lösung in Berührung, wird so fixiert und kann nach dem Auswaschen gefärbt werden. Auch hier empfehlen sich die vorhin erwähnten Färbungsmethoden.

Eine andere Methode ist die Fixierung in Hayem'scher *Flüssigkeit.* Dieselbe hat folgende Zusammensetzung: Natriumsulfat 5 gr., Kochsalz 1 gr., Sublimat 0,5 gr., Aqua destillata 200 ccm. Man läfst das Blut in diese Lösung einträufeln, von der etwa das 100fache Volumen vorhanden sein muſs. Nach 2—24 Stunden sind bei ruhigem Stehen die geformten Elemente auf den Boden des die Hayem'sche Lösung enthaltenden Gefäſses gesunken. Man gieſst jetzt ab, wäscht aus und färbt in Eosin-Hämatoxylin (VII 42, 43).

Man kann endlich drittens Blut in ein Gefäſs mit Flemming'scher Lösung einlassen, wäscht nach 2—4 Stunden Fixierung in Wasser aus, härtet und schmilzt nach der üblichen Vorbehandlung in Paraffin ein. So kann man Blutschnitte anfertigen, welche in Anilinen sich färben lassen.

Um *in Organen die Blutkörperchen gut zu erhalten,* ist besonders die Foà'sche *Lösung* geeignet (III 11), da in derselben die roten Elemente ihr Hämoglobin behalten.

Für das Studium der *Blutbildung* empfiehlt Löwitt eine Fixierung geeigneter Organe in 0,1 %—0,3 % Platinchloridlösung (III 48). Die Schnitte, die von paraffiniertem Materiale gemacht werden, sind in Safranin zu färben und nach den Vorschriften desselben Autors folgendermaſsen weiter zu behandeln. Für 10—15 Sekunden kommen die gefärbten Schnitte in eine jedesmal frisch zu bereitende Mischung von 3 – 5 ccm. einer 1 % alkoholischen Pikrinsäurelösung mit 1—2 Tropfen offizineller Jodtinktur. Hierin behalten die *Kerne der Erythroblasten und einiger fixer Zellen* eine leuchtend rote Färbung, während alles übrige entfärbt wird und daher, zufolge der Pikrinwirkung, rein gelb erscheint.

Um *farblose Blutzellen* frisch untersuchen und ihre *amöboiden Be-*

wegungen beobachten zu können, injiziert man in den *Rückenlymphsack eines Frosches* mit einer Pravaz'schen Spritze etwas Curarelösung. Nach 24 Stunden ist der Lymphsack stark mit Lymphe angefüllt, die man mit einer Pravaz'schen Spritze absaugen und tropfenweise untersuchen kann.

Die *Leukocyten* sind sehr zarte durchsichtige Gebilde, die in der farblosen Flüssigkeit nur schwer zu erkennen sind. Man mufs deshalb, zumal da wegen der Kleinheit der Gebilde starke Linsensysteme anzuwenden sind, enger Blendungen sich bedienen, denn je stärker die Belichtung des Präparates ist, um so schwieriger dürfte die Erkennung der Leukocyten werden. Man thut daher auch gut, um genau einstellen zu können, in den Tropfen ein dünnes Haar einzubringen, auf dieses zunächst zu orientieren und dann die Leukocyten aufzusuchen.

Färbung von Leukocyten nimmt man an Deckglastrockenpräparaten vor. Nach den Untersuchungen Ehrlich's kommen in den Leukocyten verschiedene Granulationen vor (dieselben sind, weil sie offenbar *Einschlüsse* der Zellsubstanz darstellen, nicht mit den Altmann'schen Granula zu verwechseln), die in ganz bestimmter Weise auf Farbstoffe reagieren. Ehrlich hat sie α—ε Granula genannt. Die *α-Granula* sind die *eosinophilen*, die Methode zu ihrer Färbung ist weiter oben bei den roten Blutkörperchen angegeben worden. Die *β-Granula* färbt man in gesättigter glyceriniger Lösung von Eosin. Die Behandlung und Aufbewahrung der gefärbten Präparate ist vorhin bei den roten Blutkörperchen schon angegeben worden. Die *γ-Granula* finden sich in den *Mastzellen;* zu ihrer Färbung dient die Ehrlich'sche *Dahliamethode* (VII 26). Die *δ-Granula* werden mit wässriger Methylenblaulösung gefärbt. Für die *ε-Granula*, die *neutrophilen Granula*, verwendet man Säurefuchsin mit Methylenblau. Zu 5 Teilen einer gesättigten wässrigen Säurefuchsinlösung wird unter stetem Umrühren 1 Teil konzentrierter wässriger Methylenblaulösung gesetzt und mit 5 Teilen Aqua destillata verdünnt. Nach einigen Tagen wird filtriert. Gefärbt wird ein Deckglastrockenpräparat mit dieser Mischung 2—5 Minuten und dann, wie dies schon früher geschildert worden, weiter behandelt.

Der *Farbstoff der roten Blutkörperchen* krystallisiert und die Krystalle sind die *Hämoglobinkrystalle.* Man kann dieselben folgendermafsen herstellen: Defibriniertes Blut wird mit etwas Schwefeläther bis zum Eintreten der Lackfarbe geschüttelt. Von diesem Blute, dessen Farbstoff gelöst ist — es dürfen keine normalen Blutkörperchen mehr anzutreffen sein — bringt man nach längerem Stehen einen Tropfen auf einen Objektträger und läfst verdunsten. Sowie die Krystalle anzuschiefsen anfangen, kann man mit einem Deckglase eindecken, das nach beendeter Krystallisierung mit Wachs zu umranden ist (IX 3); so kann man die Präparate längere Zeit aufheben.

Von hervorragend forensischer Bedeutung sind die Teichmann'schen *Häminkrystalle.* Man läfst einen Tropfen Blut auf dem Objektträger antrocknen oder bringt einen blutdurchtränkten Lappen auf einen solchen, streut einige Körnchen feinen und durch Glühen wasserfrei gemachten Kochsalzes auf den angetrockneten Tropfen und gibt 2 bis 3 Tropfen Eisessig zu. Hat man einen blutgetränkten Lappen auf dem Objektträger, so verreibt man Kochsalz und Eisessig mit dem Lappen, bis eine bräunliche Flüssigkeit entsteht und entfernt dann den Lappen. Ehe der Eisessig auseinander fliefst, wird ein Deckglas aufgelegt und über der Spiritusflamme so schnell erwärmt, dafs der

Eisessig kocht, bevor er verdampft. Nach dem Erkalten schiefsen die Krystalle an, die durch Umrandung des Deckglases mit Wachs aufbewahrt werden können.

(Die Art, das Fibrin besonders zu färben, soll bei der *Haut* genauer beschrieben werden.)

B. Organsysteme.

1. Gruppe der vegetativen Systeme.

Kap. V. Kreislaufsystem.

a) **Herz.** Die *Muskulatur des Herzens* der Vertebraten, die wie die Skeletmuskulatur quergestreift ist und von ihr sich nur durch das Fehlen des Sarkolemma und durch die Verzweigung der Fasern unterscheidet, wird im allgemeinen in der gleichen Weise untersucht, wie die Skeletmuskulatur. Die im Kapitel III dieses Abschnittes beim *Muskelgewebe* gegebenen Vorschriften der *Isolierung* der Fasern, der *Fixierung* und der *Färbung* können beim Studium der Herzmuskulatur ebenfalls angewendet werden und haben hier denselben Effekt wie dort. Es sei daher auf das im Kap. III dieses Abschnittes Gesagte hingewiesen, das wörtlich hier zu zitieren keine Veranlassung vorliegt. Nur eine Fixierungsmethode sei hier noch besonders erwähnt. Wenn Herzmuskulatur in Müller'scher Flüssigkeit (III 8) fixiert, dann nach Celloidindurchtränkung (bez. Photoxylin-) (V 5, 6) mit Karmin-Hämatoxylin nach Fritsch (VII 33) gefärbt wird, so erhält man sehr instruktive Bilder. Skeletmuskulatur gibt dagegen in Müller'scher Lösung, nach meinen Erfahrungen wenigstens, keine schönen Bilder.

Der *Klappenapparat* wird wie die Muskulatur fixiert und entweder mit dieser oder nach Herauspräparieren gesondert geschnitten. Zur Färbung dürften sich am meisten eignen Eosin-Hämatoxylin (VII 43) und Orange G-Hämatein (VII 44).

Über die *Nervenapparate des Herzens* informiert man sich am leichtesten im *Septum atriorum des Froschherzens*. Man präpariert dasselbe unter Wasser oder unter physiologischer Kochsalzlösung aus dem noch schlagenden Herzen heraus, wäscht bei verwendeter Kochsalzlösung schnell aus und vergoldet (VIII 1, 3, 5, 7). Nach eingetretener Reduktion wird ganz leicht zerzupft und in Glycerin aufbewahrt. Bei *Säugern* kommt man weder beim Septum atriorum noch beim Septum ventriculorum mit dieser Methodik aus, weil beide zu voluminös sind. Hier dürfte es sich empfehlen die schnelle Golgi'sche Methode oder eine Modifikation derselben (VIII 11, 13, 14) anzuwenden.

b) **Gefässe.** Die Struktur der *Aorta* und der *grösseren Arterien* und *Venen* studiert man am besten an Schnitten. Man fixiert in Alkohol, Flemming'scher Lösung, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 1, 21, 35, 36, 39) und färbt die Schnitte, die von paraffiniertem Materiale angefertigt werden, in Alaunkarmin, Karmalaun, Böhmer'schen Hämatoxylin, Glycerinalaunhämatein, Orange G-Hämatein (VII 6, 9a, 12, 19, 40) oder sonst irgendwie nach individuellem Geschmack. Auch Müller'sche Lösung (III 8) kann zur Fixierung mit Vorteil verwendet werden.

Kleinere Arterien und Venen untersucht man am erfolgreichsten in den einzelnen Organen, die aber zu diesem Zwecke nicht injiziert sein dürfen. Man findet in allen Organen, besonders den *drüsigen*, stets eine Menge Quer-, Schräg- und Längsschnitte der Gefässe, die genügend instruktive Bilder liefern. Färbung in Eosin-Methylblau (VII 46) läfst die Blutgefäfse rot hervortreten.

Die *Kapillaren* injiziert man mit einer 1 % wässrigen Lösung von Argentum nitricum, indem man z. B. in eine mittlere Arterie des *Mesenterium des Frosches* oder eines kleinen *Säugetieres* die Kanüle einer Pravaz'schen Spritze einführt und von hier aus die Gefäfsbahnen füllt. Die Reduktion läfst man sich im Tageslichte vollziehen, doch dürfen die betreffenden Membranen (Mesenterien) nicht in Kochsalzlösung übergeführt werden, oder aber man verfährt nach der Deckhuyzen'schen Methode (VIII 10).

Übersichtspräparate von kleinen Arterien, Kapillaren und Venen, die sehr instruktive Bilder liefern und namentlich für Anfänger sehr wertvoll sind, erhält man nach der Empfehlung von Orth, wenn man die *Pia mater eines Säugetiergehirnes* untersucht. Man faſst ein Stück Pia mit einer feinen Pinzette, so daſs die Gefäfse aus der Hirnrinde sich herausziehen. Mit einem feinen Haarpinsel, der stets mit 0,75 % Kochsalzlösung feucht zu erhalten ist, entfernt man durch sanftes Streichen die anhaftenden Hirnteile. Man kann das so erhaltene Präparat noch ganz leicht zerzupfen. Will man vergolden (VIII 1, 7), so muſs man in destilliertem Wasser abspülen; sonst färbt man am besten in Pikrokarmin (VII 35, 36).

c) **Blutgefäfsbildung.** Man kann selbstverständlich die Blutgefäfsbildung an den *Embryonen aller Vertebratenklassen* studieren; will man sich vorläufig über die Modalitäten dieses Vorganges *orientieren,* so wähle man den *Saum der Schwanzflosse von Froschlarven.* Man fixiere denselben in Flemming'scher Lösung oder Pikrinsalpetersäure (III 21, 35) und färbe mit Fuchsin oder Safranin nach substantiver Art (VII 21, 22, 23).

I. Anhang zu Kap. V.

Die Blutgefäfsdrüsen und Lymphknoten.

a) **Die Milz.** Die *zelligen Elemente* dieses Organes kann man *frisch* in der Weise untersuchen, daſs man mit einem Skalpell z. B. eine *Kaninchenmilz* anschneidet, die Schnittfläche mit der Messerschneide abstreift und die so aus dem Parenchym ausgepreſsten Zellen in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung bringt. Indessen wird man dadurch doch immer nur zu ungenügenden Resultaten kommen. Die Zellen der Milz müssen auf *Schnittpräparaten* studiert werden, die von gut fixiertem Materiale herstammen. Die Auswahl der Fixierungsflüssigkeit ist aber nicht gleichgiltig, sie muſs vielmehr entsprechend dem Untersuchungszwecke ausgewählt werden. Will man nur *Übersichtspräparate* gewinnen, so genügt ein Erhärten in Müller'scher Flüssigkeit (III 8) und ein Färben der Schnitte in ammoniakalischem Karmin oder Pikrokarmin (VII 1, 35, 36). Beabsichtigt man tiefer in den Bau einzudringen, dann muſs man andere Fixierungsmittel nehmen und auch die Tierspezies genau berücksichtigen. Zum Zellenstudium

sind vortrefflich geeignet die *urodelen Amphibien;* die Pulpa und die sogenannten Malpighi'schen Körperchen (Lymphknötchen) treten sehr deutlich hervor an der Milz der *Nagetiere*, die Trabekel an der der *Huftiere*, während beide Bestandteile im Gleichgewicht sind in der Milz der *Hunde, Katzen* und des *Menschen.*

Für *Zellenstudien* eignet sich die Milz der *Amphibien* und der *Nagetiere.* Um *Teilungserscheinungen* zu beobachten, fixiert man in Flemming'scher Lösung oder Hermann'scher Flüssigkeit oder nach der Benda'schen Salpetersäure-Kali bichronicum-Methode (III 21, 50, 15) und färbt die Schnitte — ich würde bei der Milz *für diese Zwecke* von einer Stückfärbung dringend abraten — mit Safranin-Gentiana nach Flemming oder Hermann oder nach Flemming's Orangeverfahren (VII 47, 48, 54) oder wendet den Eisenhämatoxylinlack von Benda oder den Kupferhämatoxylinlack desselben Autors an (VII 57, 58).

Zum Studium der *Blutbildung* fixiert man in Foà'scher Lösung (III 11) und färbt in Eosin-Hämatoxylin (VII 43) oder fixiert in Platinchlorid (III 48) und färbt nach Löwitt mit Safranin so, wie es vorhin beim Kapitel „Blut" beschrieben wurde. Oder endlich man fixiert in Alkohol oder Sublimat oder Sublimat-Eisessig (III 1, 39, 40) und färbt die Schnitte mit dem Ehrlich-Biondi'schen Farbengemisch oder dem Triacidgemisch (VII 52, 53).

Welche Fixierungsflüssigkeit man auch wählen möge, immer mufs man die Milz, abgesehen von dem Organe der Amphibien, stark zerkleinern, da dieselbe sich nur sehr schwer durchtränkt. Auch ist es nicht leicht, gute Schnitte von paraffiniertem Materiale zu erhalten, da die Milz leicht brüchig wird — man beachte daher die im ersten Abschnitte im Kapitel „Schneiden" gegebenen Vorschriften — und ferner mufs man dünne Schnitte, $3\,\mu$—$5\,\mu$, anfertigen.

Will man die *Trabekel* untersuchen, so kann man in Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure oder Sublimat fixieren (III 35, 36, 39) und nimmt entweder Stückfärbung in alkoholischem Boraxkarmin vor (VII 4) oder färbt die Schnitte in Alaunkarmin, Karmalaun oder Orange G-Hämatein (VII 6, 9^a, 44).

Die *Injektion der Blutgefässe,* welche grofse Schwierigkeiten bereitet, erfolgt am besten mit warmen Flüssigkeiten, die der *Lymphgefässe* durch Einstich mit kalten Lösungen (X 1, 2, 4). Empfehlenswert ist für die Gewinnung von *Übersichtsbildern der Gefässverteilung* die Altmann'sche Korrosionsmethode (X 5).

b) **Die Lymphknoten.** Dieselben Regeln, welche bei der Fixierung der Milz und der Färbung von Schnitten derselben gegeben wurden, greifen auch hier Platz, sodafs das eben bei a Gesagte hier buchstäbliche Anwendung findet. Zur Färbung sind auch die beim Blut (Kap. IV Abschnitt II) für die Leukocyten angegebenen Methoden Ehrlich's zu verwenden. Zur Erkennung des *Stützgewebes der Lymphknoten* bedient man sich der His'schen Pinselmethode oder der Schüttelmethode (II 29, 30). Man kann die Schnitte, die von einem in Müller'scher Lösung fixierten Organe *ohne Einbettung* gemacht wurden, ohne weiteres in Wasser pinseln oder schütteln. Hat man dagegen anderweitig fixiert und in Paraffin eingebettet, so dürfte es sich empfehlen, die nicht zu dünnen Schnitte (15—20 μ) erst aufzukleben, um das Paraffin entfernen zu können und dann aus dem zum Austreiben des Xylols oder Terpentins verwendeten Alkohol in eine leicht alkalische

Flüssigkeit einzubringen, entweder in eine gesättigte wässrige Lösung von Lithion carbonicum oder in ammoniakalisches Karmin (VII 1) oder Lithionkarmin (VII 2). Hierin löst sich das zum Aufkleben verwendete Eiweifs, die Schnitte werden frei und können nunmehr der gewünschten Prozedur des Pinselns oder Schüttelns unterworfen werden. Der Vorzug dieser Methode scheint mir darin zu liegen, dafs man so die starken Diffusionsströmungen vermeidet, welche beim Überführen der Schnitte aus dem Terpentin in den Alkohol und aus diesem in das Wasser notwendig eintreten, und durch welche die Schnitte sehr leicht zerstört werden. Müller-Präparate färbt man in Pikrokarmin (VII 35, 36). Zur dauernden Aufbewahrung bringt man die gefärbten Präparate in Glycerin (IX 1) oder nach der Entwässerung in einem Tropfen Alkohol auf den Objektträger, breitet vorsichtig mit einem feinen Haarpinsel glatt aus, saugt mit etwas Fliefspapier den Alkohol ab und gibt einen Tropfen venetianisches Terpentin zu (IX 7). Um Kanadabalsam anzuwenden, bringt man ebenfalls auf den Objektträger, saugt den Alkohol sehr sorgfältig ab, gibt vorsichtig einen Tropfen Bergamottöl oder Nelkenöl zu (IX 9, 10), achtet darauf, dafs der Schnitt nicht zu stark durch die Diffusionsströmungen hin und her getrieben wird, saugt ab und tropft Balsam auf.

Die *Lymphgefässverteilung* studiert man an den gröfseren Knoten durch Injektion der Vasa afferentia, bei den kleineren, z. B. den Peyer'schen Haufen, durch Einstichinjektion.

c) **Die Mandeln.** Man verfährt beim Fixieren genau wie bei Milz und Lymphknoten.

d) **Der Thymus.** Die Methodik ist dieselbe wie bei a und b, das Organ durchtränkt sich sehr schwer, daher starke Zerkleinerung; die Schnitte müssen sehr dünn sein.

II. Anhang zu Kap. V.

Drüsen mit unbekannter Funktion.

a) **Die Thyreoidea.** *Frisch* das Organ zu untersuchen hat, wenn keine besonderen pathologischen Veränderungen erwartet werden, in welchem Falle die frische Untersuchung zur vorläufigen Orientierung dienen kann, keinen Zweck. Man fixiert *kleine Stücke* der Schilddrüse in Pikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 35, 39) und mufs dieselben, da sie hier schwer eindringen, mindestens 24 Stunden einwirken lassen. Flemming'sche Lösung (III 21) ist weniger empfehlenswert, da die Thyreoidea darin leicht brüchig wird; bei Anwendung der Lösung mufs aber die Einwirkung auf 48 Stunden verlängert werden, sonst sind die zentralen Teile nicht gut fixiert. Zur Färbung verwendet man nach Flemming'scher Lösung Fuchsin oder Safranin (VII 21, 23) und nach Pikrinsalpetersäure oder Sublimat Eosin-Hämatoxylin oder Orange G-Hämatein (VII 43, 44). In letzteren Farbflotten werden die Kerne der Zellen blau, die Kolloidsubstanz leuchtend rot bez. hellorange.

b) **Hypophysis, Steifsdrüse und Carotidendrüse** werden wie die Thyreoidea behandelt. Bei der Hypophysis kann man zur Erkennung

der Verhältnisse im hinteren kleineren und nervösen Abschnitte die schnelle Golgi'sche Methode und deren Modifikationen anwenden (VIII 11, 13, 14).

c) **Die Nebenniere.** Man fixiert in Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure, Sublimat oder Müller'scher Lösung (III 35, 36, 39, 8) und färbt in Alaunhämatoxylin bez. -hämatein oder Karmin-Hämatoxylin (VII 12, 14, 18, 19, 33). Die Schnittrichtung muſs entweder parallel zum Längs- oder Dickendurchmesser gewählt werden; Schnitte in der Querachse geben keine orientierenden Bilder. Um die *Nervenapparate* dieses Organs zu studieren ist die Anwendung der schnellen Golgi'schen Methode und deren Modifikationen empfohlen worden (VIII 11, 13, 14).

Kap. VI. Atmungssystem.

a) **Die Luftwege.** Das *knorplige Gerüst* des *Kehlkopfes* untersucht man nach den Regeln, welche für die Untersuchung der *Knorpel* in dem II. Kapitel dieses Abschnittes aufgestellt wurden (cf. daselbst).

Die *Schleimhäute der Luftwege* sind *frisch* zu untersuchen, um die Bewegungen der Haare des Flimmerepithels studieren zu können. Man öffnet zu diesem Zwecke bei einem eben getödteten *kleinen Säugetiere* die *Trachea*, hebt mit einer feinen Pinzette eine Schleimhautfalte hoch, schneidet diese an ihrer Basis ab und bringt sie in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung. Man stellt auf den Rand des Präparates ein.

Zur *Fixierung*, um eventuell Dauerpräparate erhalten zu können, ist absoluter Alkohol, Müller'sche Lösung, Benda's Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode, Pikrinsalpetersäure oder Sublimat zu empfehlen (III 1, 8, 15, 35, 39). Man bettet entweder in Photoxylin (Celloidin) oder Paraffin ein. Zur Färbung von Müller-Präparaten eignet sich ammoniakalischer Karmin (VII 1) — bei Paraffinschnitten: Aufkleben mit destilliertem Wasser — oder Pikrokarmin (VII 35, 36). Nach den anderen Fixierungsflüssigkeiten nimmt man entweder Stückfärbung in alkoholischem Boraxkarmin vor (VII 4) oder färbt die Schnitte in Alaunhämatoxylin (VII 12, 14, 18, 19), Eosin-Hämatoxylin, Orange G-Hämatein oder Bismarckbraun (VII 43, 44, 29). Im letzteren Farbstoffe treten besonders schön die *Becherzellen* hervor.

b) **Die Lungen.** Zur Untersuchung der *Lungen* sind am besten Schnittpräparate geeignet, während für das Studium des *Kiemenepithels* Isolationen sehr wichtig sind. Zu letzterem Zwecke empfiehlt sich die Anwendung von $^1/_3$ Alkohol, $^1/_4$ Alkohol, die beide sehr lange einwirken müssen, Chromsäure, Drost'sches Gemisch, Pikrinsäure, Pikrinsäurealkohol und vielleicht (!) auch Rohrzucker mit schwefliger Säure (II 1, 3, 7, 16, 17, 18, 26).

Zur *Fixierung von Lungen und Kiemen* versuche man Müller'sche Flüssigkeit, Chromessigsäure, Flemming'sche Lösung, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 8, 6, 21, 35, 36, 39) und färbe die Schnitte in Alaunkarmin bez. Karmalaun (VII 6, 9a) oder Alaunhämatoxylin (VII 12, 14, 18, 19).

Um *das die Lungenalveolen auskleidende Endothel* zur Anschauung zu bringen, behandelt man entweder einen vom *frischen* Materiale mit

Valentin'schen Doppelmesser (I 7) angefertigten Schnitt mit Argentum nitricum-Lösung (VIII 9, 10) und zerzupft bei Anwendung von VIII 9 nach eingetretener Reduktion in verdünntem Glycerin oder zerzupft bei VIII 10 im Nelkenöl. Oder aber man injiziert mit einer kleinen Spritze eine $^1/_2$%—1% Lösung von Argentum nitricum in einen Bronchiolus, härtet nach eingetretener Reduktion in Alkohol und untersucht den feucht angefertigten, nicht zu dünnen Schnitt in Glycerin.

Zum Studium der *Gefässverteilung* in Lungen und Kiemen ist die Injektion mit gefärbten warmflüssigen Massen (X 1, 2) unbedingt erforderlich. Die Bilder sind um so instruktiver, wenn Arterie und Vene zu gleicher Zeit mit verschiedenfarbigen Massen gefüllt sind. Auch dürfte die Altmann'sche Korrosionsmethode (X 5) zur Gewinnung von Übersichtsbildern sehr zu empfehlen sein.

Kap. VII. Verdauungssystem.

a) **Verdauungskanal.** Zur *Isolation der Epithelzellen des Magens und Darms* sind $^1/_3$ Alkohol, $^1/_4$ Alkohol, dünne Chromsäure, 0,1% Osmiumsäure und die Hopkins'sche Salpetersäure-Alaunmethode geeignet (II 1, 3, 7, 13, 24). Bei *Kaltblütern* muss die Einwirkung des Reagens mehrere Tage dauern, das Reagens selber ist daher, wenn es nicht klar bleibt, zu wechseln; bei *Warmblütern* ist schon nach 24 Stunden eine gute Isolation möglich. Auch nach Vergoldung nach der Cohnheim'schen Methode (VIII 1) kann man gute Zupfpräparate erhalten, wenn man nach eingetretener Reduktion ein Stückchen Schleimhaut mit einer gebogenen Schere abträgt und dieses in verdünntem Glycerin zerzupft. Auf die letztere Art hergestellte Präparate halten sich sehr lange.

Zur *Fixierung* eignen sich Chromsäure, Müller'sche Flüssigkeit, Zenker'sche Lösung, Benda's Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode, Flemming'sche Lösung, Pikrinsalpetersäure und Sublimat (III 3, 8, 12, 15, 21, 35, 39). Widerraten möchte ich reine Pikrinsäure und Pikrinschwefelsäure. Die Präparate aus Müller'scher Lösung kann man feucht, *ohne Einbettung*, schneiden und erhält nach Färbung in ammoniakalischem Karmin, Lithionkarmin, Pikrokarmin oder Pikrolithionkarmin (VII 1, 2, 35, 36, 38) sehr instruktive, namentlich bei Kursen verwertbare Übersichtspräparate. Schnitte vom *Magen* färbt man auch mit Vorteil in Karmin-Hämatoxylin nach Fritsch (VII 33). Zur Fixierung des Verdauungskanals der *Tracheaten* sind die genannten Fixierungsmittel heifs, bei circa 60°—70° C., anzuwenden, und zwar sind die Organe in die *bereits heisse* Lösung einzubringen. Vorzügliche Dienste leistet auch bei Tracheaten, wie überhaupt bei *Crustaceen*, die Sublimat-Salpetersäure-Mischung von Frenzel (VII 42).

Es ist, soweit meine eigene Erfahrung reicht, *sehr schwer*, die einzelnen Partieen des Verdauungskanales gut zu fixieren; man bekommt namentlich von den *Magen- und Darmdrüsen* trotz der gröfsten angewandten Sorgfalt sehr häufig ganz unbrauchbare Bilder, wo man mit Sicherheit auf einen günstigen Erfolg glaubte rechnen zu können. Den Darmkanal vom *Flusskrebs* (Astacus fluviatilis) habe ich überhaupt noch nicht befriedigend fixieren können. Die zuverlässigsten Reagentien sind die Pikrinsalpetersäure und die Flemming'sche Lösung. Unter allen Umständen mufs der Darmkanal vom eben getöteten Tiere ent-

nommen werden, er mufs bei *Warmblütern* noch warm sein und noch peristaltische Bewegungen zeigen; ist das nicht der Fall, so ist das Material ganz unbrauchbar. Auch thut man gut, bei *Säugern* nicht alte, sondern junge Tiere zu wählen. Bei alten Tieren ist die Submucosa meistens so zäh, fast sehnig, dafs ihre Durchtränkung in Paraffin fast unmöglich ist. Überhaupt geht Paraffin in den Verdauungskanal, namentlich in den Magen der *Säugetiere*, schwer hinein; die Objekte müssen daher sehr lange in Chloroform verweilen, bis zu 8 Tagen. Infolge seines grofsen Muskelreichtums kontrahiert sich der Darmkanal bei der Fixierung sehr heftig; man mufs ihn daher, wenn es auf eine genaue Bestimmung der Schnittrichtung ankommt, sorgfältig vor dem Fixieren ausstrecken. Mehr als bei jedem anderen Objekte ist hier auf ein völliges Klarbleiben der Fixierungsflüssigkeit zu achten. Der dem Epithel des Darmtraktus anhaftende Schleim trübt das Reagens, das daher so lange zu erneuern ist, bis es klar bleibt.

Zur *Färbung* von Schnitten durch den *Magen* empfiehlt sich Hämatoxylin (VII 12, 14, 18, 19) und die Fritsch'sche Kombination Karmin-Hämatoxylin (VII 33). Schnitte vom Darmkanal färbe man mit Fuchsin, Safranin oder Bismarckbraun (VII 21, 23, 24, 29). Letzterer Farbstoff nach Pikrinsalpetersäure-Fixierung angewandt liefert ganz ausgezeichnete Bilder; besonders treten intensiv dunkelbraun gefärbt die *Becherzellen* hervor, welche nach Färbung in Fuchsin oder Safranin einen intensiv violetten Ton annehmen. Ebenso liefert vortreffliche Bilder nach Pikrinsalpetersäure die Färbung in dem Ehrlich-Biondi'schen Dreifarbengemisch (VII 51).

Der *Nervenapparat des Darmes* ist bekanntlich ein doppelter; man unterscheidet den submukösen Plexus von Meissner und den sogenannten Plexus myentericus von Auerbach. Um den ersteren zu präparieren, legt man ganz frische *Dünndarm- oder Colonstücke vom Meerschweinchen oder der Maus* — Kaninchen und Hund sind hierfür weniger geeignet, weil die einzelnen Darmhäute zu dick sind — in eine dünne Lösung gereinigten Holzessigs oder in eine Essigsäure von etwa 0.1 %. Noch besser aber füllt man ein Stück unaufgeschnittenen Darms, dessen eines Ende zugebunden ist, mit einer der Lösungen an, bindet das andere Ende ebenfalls zu und legt das Stück in den Holzessig oder die Essigsäure. Häufig schon nach 24 Stunden, manchmal erst nach 2 oder 3 Tagen ist die Präparation möglich, die so vorgenommen wird, dafs man am aufgeschnittenen und fest ausgespannten Darme mit einer auf die Fläche gebogenen feinen Schere die Mucosa leicht anschneidet, in die Schnittöffnung eine feine Pinzette mit glatten Branchen schiebt, zuerst die Mucosa und dann die sehr dünne Submucosa sorgfältig und schonend abzieht. Letztere untersucht man entweder in dünnem Glycerin oder man vergoldet (VIII 1, 58) und hebt in verdünntem Glycerin auf. Das Nervengeflecht mit den Ganglienhaufen tritt jetzt sehr schön hervor. In gleicher Weise kann man verfahren, wenn man den Plexus myentericus Auerbach's untersuchen will, nur dafs man in diesem Falle die Submucosa zusammen mit der Mucosa abzieht. Auch hier liefert die Vergoldung sehr schöne Bilder.

Zur Untersuchung des Darmnervenapparates der *Lungenschnecken* genügt ein etwa 12stündiges Einlegen in dünne Essigsäure mit nachfolgender Vergoldung.

Anstatt des Holzessigs oder der Essigsäure kann man auch nach der Angabe von Leo Gerlach für 12—24 Stunden in verdünnte Lösung

des doppelt chromsauren Kali einlegen oder für gleiche Zeit in 1.0 % Kochsalzlösung bringen. Letztere Methoden ermöglichen ein Nachfärben in Karmin.

Die *Lymphknoten des Darmkanales* (Peyer'sche Haufen und solitäre Follikel) untersucht man wie die grofsen, isoliert vorkommenden Lymphknoten.

Die *Blutgefässe* werden von einer im Mesenterium verlaufenden Arterie oder Vene aus injiziert.

Sehr wichtig ist das Studium der *Lymphgefässe* der Darmzotten. Entweder nimmt man dazu injiziertes Material, das durch Einstichinjektion hergestellt wurde, oder man untersucht den frischen Darm eines Tieres, das circa 5—6 Stunden nach einer reichlichen Mahlzeit getödtet wurde.

b) **Die grofsen Verdauungsdrüsen.** *α) Die Elemente der Speicheldrüsen* — Parotis, Submaxillaris, Sublingualis und Pankreas — zu isolieren, hat wenig Zweck. Will man einzelne Drüsenschläuche haben, so kann man Oxalsäure oder reine Salzsäure (II 20, 28) verwenden. Auch mit Lysol dürfte sich ein Versuch lohnen (III Anhang 1). Wirklich verwertbare Bilder erhält man nur an *Schnitten*, die von sorgfältig fixiertem und in Paraffin eingebettetem Materiale angefertigt wurden.

Man mufs sich beim Studium der Speicheldrüsen gegenwärtig halten, dafs die Funktion derselben eine kontinuierliche ist, da dauernd Sekret abgesondert wird. Man trifft daher in jeder Drüse neben Zellen, welche mit Sekret erfüllt sind, solche an, die sekretleer sind. Das bedingt natürlich eine Differenz im färberischen Verhalten dieser Zellen und darauf ist daher Rücksicht zu nehmen bei der Auswahl der Färbungsmethoden. Um die verschiedenen Stadien der Sekretion genauer studieren zu können, hat man die Nerven der Drüsen mit dem induzierten Strome gereizt. Eine solche „gereizte" Drüse ist erschöpft, sekretleer.

Als Fixierungsmittel stehen meines Erachtens obenan Flemming'sche Lösung und Pikrinsalpetersäure (III 21, 35), weniger gut sind absoluter Alkohol und Sublimat (III 1, 39), ganz zu widerraten sind meines Erachtens reine Pikrinsäure und Müller'sche Lösung. Zur Färbung sind geeignet in erster Linie Eosin-Hämatoxylin, Orange G-Hämatein, Ehrlich-Biondi'sches Gemisch und Bismarckbraun (VII 43, 44, 51, 29). In Mucindrüsen ist das Mucin intensiv in Hämatoxylin bez. Bismarckbraun gefärbt, während die Zellsubstanz und die sekretleere Zelle wenig Farbstoff aufgenommen haben. In Eiweifsdrüsen, für welche Bismarckbraun sich weniger eignet, tritt die Färbung durch die sauren (Plasma-) Farbstoffe intensiv hervor. Aufserdem sind noch Safranin (VII 24), in welchem die Mucinmassen violett werden, und Kupferhämatoxylin (VII 58) sehr zu empfehlen.

Um die *Nerven in den Drüsen* verfolgen zu können, kann man mit Erfolg die Marinescu'sche Goldmethode (VIII 5), die Golgi'sche schnelle Methode (VIII 11, 13, 14) oder die Ehrlich'sche vitale Methylenblaufärbung anwenden (VII γ). Bei der letzteren nehme man kleine frische Drüsenstückchen, die man mit einem Rasiermesser in nicht zu dünne Schnitte zerlegen mufs.

β) Die Leber. Zur *Fixierung* — denn Isolationspräparate zu studieren hat keinen Zweck und frisches Material schneidet man mit dem Valentin'schen Doppelmesser — ist am besten Alkohol, Pikrinsalpetersäure und Müller'sche Lösung (III 1, 35, 8). Andere Fixierungs-

flüssigkeiten haben keinen Vorteil. Zur Färbung dient am besten Alaunkarmin bez. Karmalaun (VII 6, 9a) oder Alaunhämatoxylin bez. -hämatein (VII 12, 14, 18, 19). Nur wenn man Zellteilungsfiguren in embryonalen Gebilden studieren will, dürfte sich Flemming'sche Lösung zur Fixierung III 21) und Fuchsin, Safranin oder Flemming's Orange-Verfahren (VII 21, 23, 23, 54) zur Färbung empfehlen.

Zur Darstellung der *sogenannten Gallenkapillaren* bedient man sich der folgenden von Böhm und Oppel zuerst angewendeten Versilberungsverfahren. Leber vom frisch getödteten *Kaninchen* kommt in eine Lösung von Kali bichromicum von 2 %, die rasch auf 5 % gesteigert wird. Nach 3 Wochen wird in ¾ % Lösung von Argentum nitricum übergeführt, in welcher nach 8 Tagen die sogenannten Gallenkapillaren gefärbt sind. Zur Darstellung der *Gitterfasern der Leber* kann die folgende Oppel'sche Versilberungsmethode angewandt werden. Leber, die in Alkohol gehärtet ist (sie kann bereits 1 Jahr im Alkohol liegen), kommt in Stücken von 1 cm. Seite in eine ½ % wässrige Lösung von Kali chromicum flavum, also des neutralen Salzes — für gröfsere Stücke kann die Konzentration bis zu 4 %—5 % gesteigert werden — und bleibt darin 24 Stunden. Darauf wird sie in einer Lösung von Argentum nitricum (einige Tropfen einer ¾ % Lösung auf 30 ccm. Aqua destillata) abgewaschen und in eine ¾ % Lösung von Argentum nitricum übergeführt. Schon nach 1 Stunde färben sich die Gitterfasern. Nach 24 Stunden wird in destilliertem Wasser abgespült und in Alkohol gehärtet. Eventuell kann in Paraffin eingeschmolzen werden.

Zum Studium der *Blutgefässe* müssen Injektionen von der Arteria, Vena hepatica und Vena portarum aus gemacht werden. Die Gefäfsbezirke werden entweder für sich allein oder kombiniert angefüllt.

Die *Verzweigungen des Ductus hepaticus* kann man durch Injektion desselben deutlich machen.

Kap. VIII. Harnsystem.

a) **Die Niere.** Will man die *Kanäle* der Nierensubstanz isolieren, so nehme man die Niere eines *kleinen Säugetieres*, schneide dieselbe in nicht zu kleine Stücke und werfe diese in reine Salzsäure (II 28), welche die besten Resultate liefert, oder in Oxalsäure (II 20). Nach Beendigung der Mazeration wird ausgewaschen und eventuell in neutralem Karmin gefärbt, ehe man die Isolation vornimmt. Das neutrale Karmin stellt man sich in der Weise nach Fritsch her, wie dies bei Besprechung der Doppelfärbung Karmin-Hämatoxylin (VII 33) auseinandergesetzt wurde. Noch eine andere Methode gibt es, um die Kanäle der Niere zur Anschauung zu bringen, die indessen sehr schwer auszuführen ist und durchaus nicht immer einen Erfolg verspricht. Diese Methode ist die *Injektion des Kanalsystems vom Ureter aus.* Statt, wie bei den Gefäfsinjektionen, die Kanüle der Injektionsspritze in ein Blutgefäfs einzubinden, bindet man sie in den Ureter ein und füllt von hier aus die Kanüle. Die Schwierigkeit beruht darin, die Injektionsflüssigkeit durch das Nierenbecken in die Sammelröhren zu treiben. Nach der Injektion bringt man in absoluten Alkohol ein und schneidet entweder nach blofser Umrandung oder nach Einbettung in Photoxylin (Celloidin).

Zur *Fixierung der Niere*, die vorgenommen werden mufs, wenn man die Beschaffenheit der *Epithelzellen* in den einzelnen Abschnitten des Organes kennen lernen will, eignet sich am besten absoluter Alkohol (III 1), mit dem man vorher auch zweckmäfsig die Arterie ausspritzt. Aufserdem ist noch Pikrinsalpetersäure zu empfehlen (III 35), während für die Niere der *Säuger* andere Reagentien keinen Vorteil gewähren. Die Dauer der Fixierung mufs bei Pikrinsalpetersäure mindestens 24 Stunden betragen. Zur Fixierung der *Niere wirbelloser Tiere und der Amphibien* können mit Erfolg Flemming'sche Lösung, Pikrinsalpetersäure oder Sublimat angewandt werden (III 21, 35, 39). In Flemming'scher Lösung fixierte Organe schmilzt man in Paraffin ein und färbt mit Fuchsin oder Safranin (VII 21, 23, 24). Nach den anderen Fixierungsmethoden nimmt man entweder Stückfärbung in alkoholischem Boraxkarmin oder Parakarmin vor (VII 4, 10) und schmilzt in Paraffin oder bettet in Photoxylin (Celloidin) ein oder man färbt die Schnitte in Alaunkarmin, Karmalaun oder einem Alaunhämatoxylin bez. -hämatein (VII 6, 9a, 12, 14, 18, 19). Nur wenn Zellstrukturen studiert werden sollen und bei den Nieren der wirbellosen Tiere kann man zu komplizierteren Färbungsmethoden greifen, deren Auswahl dann von dem zu erreichenden Zwecke abhängig ist.

Sehr wichtig ist das *Studium der Gefässverteilung* in den Nieren. Man soll, wenn möglich, Arterie und Vene mit verschieden gefärbten Massen ausspritzen. Nach der Injektion härtet man und färbt die von dem in Photoxylin (Celloidin) eingebetteten Materiale oder auch nach blofser Umrandung angefertigten Schnitte so, dafs der Farbstoff, der nur die Kerne der Nierenepithelien hervorheben soll, einen Kontrast zu den Injektionsmassen bildet.

Über die Injektion mit *indigschwefelsaurem Natron* cf. die Lehrbücher der Physiologie.

b) **Die ausführenden Wege.** *Nierenkelche und Nierenbecken*, wenn man sie gesondert von der Niere untersuchen will, fixiert man in Alkohol oder Pikrinsalpetersäure (III 1, 35). Vor dem Einbringen in das Reagens mufs man diese Gebilde auf einer unnachgiebigen Unterlage befestigen, damit sie sich nicht einrollen. Man schmilzt in Paraffin ein und färbt beliebig.

Der *Ureter* wird in derselben Weise wie die vorigen Gebilde fixiert; auch hier kann die Färbungsflüssigkeit beliebig gewählt werden. Damit der Ureter, den man zum Fixieren am besten nicht aufschneidet, sich nicht krümmt, wird er so auf einer Unterlage angebracht, dafs man um die beiden Enden des von ihm zu fixierenden Stückes je einen Faden legt, der fest genug schliefsen mufs, um die Verkrümmung zu verhüten, und doch hinwiderum nicht so fest sein darf, dafs das Lumen desselben verschlossen wird.

Die *Epithelien der Blase*, und das Folgende gilt auch für die *Nierenkelche* und *Nierenbecken*, isoliert man mittels $^1/_3$ Alkohol, dünner Chromsäure, dünner Pikrinsäure oder, und diese Methode gewährt die besten Resultate und ist die sicherste, mittels Rohrzucker und schwefliger Säure (II 1, 4, 17, 26).

Die *Muskulatur der Blase* ist als Paradigma für die glatten Muskelfasern anzusehen; zu ihrem Studium geht man daher so vor, wie dies im III. Kapitel dieses Abschnittes bei „glatte Muskeln“ empfohlen wurde.

Um *Schnittpräparate* von der Blase anfertigen zu können, dürfte es sich empfehlen, damit Zerrungen und Verkrümmungen vermieden werden, die Blase *kleiner Säugetiere* mit der Fixierungsflüssigkeit anzufüllen, zuzubinden und das Organ somit in seiner natürlichen Ausdehnung in ein grofses Quantum derselben Fixierungsflüssigkeit, die beliebig gewählt werden kann, einzulegen. Zur langsamen Erhärtung läfst man zunächst das in's Innere der Blase gebrachte Reagens heraus, füllt mit dem Alkohol der jeweiligen Konzentrationsstufe an und bringt das ganze Organ in die erhärtende Flüssigkeit. Bei gröfseren Blasen dagegen mufs man dieselben in kleine Stücke zerlegen, die vorher zu befestigen sind. Selbstverständlich ist hierbei, wie allenthalben da, wo eine solche Befestigung auf unnachgiebiger Unterlage vorgenommen wird, sorgfältig darauf zu achten, dafs nicht etwa die Epithelseite mit der Unterlage in Berührung kommt, dieselbe mufs vielmehr stets frei bleiben. Färbung der Blasenschnitte gleichgiltig.

Harnröhre und Glans penis fixiert man am besten in Alkohol (III 1) und bettet die durchgefärbten Stücke in Photoxylin (Celloidin) ein.

Um die *Nervenverteilung in der Blase* studieren zu können, vergoldet man nach Cohnheim, Ranvier oder Golgi (VIII 1, 4, 7). Kleine Blasen, z. B. von *Amphibien* oder *kleinen Säugern* bringt man, nachdem man sie durch sehr kurzes Spülen in Wasser von dem Urin gereinigt hat, direkt in die Goldlösung und entfernt nach eingetretener Reduktion durch Pinseln die Epithelzellen. Bei den Blasen *grösserer Säugetiere* dürfte es richtiger sein. erst das Epithel zu entfernen und zwar am besten durch die Rohrzucker — schweflige Säuremethode (II 26) und dann nach genügendem Auswaschen zu vergolden. Wir wissen ja durch die Sandmann'sche Methode (II 27), dafs die schweflige Säure der Vergoldung kein Hindernis bereitet und dafs die Nerven durch dieselbe nicht alteriert werden (cf. peripheres Nervensystem).

Vielfach wird in neuester Zeit die vitale Methylenblaufärbung (VII γ) zum Studium der Blasennerven angewendet.

Kap. IX. Geschlechtssystem.

a) Weibliche Geschlechtsorgane.

a) **Eierstöcke.** Die Behandlung der entleerten *Eier* soll im Anhange zu diesem Kapitel besonders besprochen werden. hier wird nur das Ei bildende Organ berücksichtigt.

Zur Fixierung des *Ovarium* kann man Alkohol absolutus. Perényi'sche Flüssigkeit, Benda's Salpetersäure-Kali bichromicum Methode. Flemming'sche Lösung, Pikrineisessig, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure, Sublimat oder Sublimateisessig nehmen (III 1, 7. 15, 21, 31, 35, 36, 39, 40); auch Sublimatsalpetersäure dürfte nicht ohne Vorteil verwendet werden (III 42). Die Ovarien fixieren sich sehr schwer, d. h. sind schwer durchgängig für die Fixierungsflüssigkeiten. deshalb ist es ratsam, die Organe, namentlich der gröfseren Säuger, in Stücke von 5—6 mm. Breite zu zerlegen. Diese Zerkleinerung mufs natürlich unterbleiben, sowie es sich um Übersichtsbilder des ganzen Organes handelt, und kann unterbleiben bei den Organen neugeborener und denen noch nicht geschlechtsreifer Tiere. Die Fixierungsflüssigkeit mufs mindestens 24 Stunden einwirken, man kann aber

auch die Dauer derselben erheblich verlängern bis zu 48 und 72 Stunden; dies dürfte sich namentlich bei der FLEMMING'schen Lösung empfehlen.

Die Ovarien durchtränken sich schwer mit Paraffin, sie müssen daher sehr genau, mindestens 48 Stunden, entwässert werden und gut mit Chloroform durchzogen sein. Sie können in letzterem Reagens 5—6 Tage verweilen, ohne dafs man Nachteile zu befürchten hat. Will man nur die Konfiguration des Organes studieren, so kann man Stückfärbung vornehmen (dieselbe ist nach Fixierung in FLEMMING'scher Lösung ausgeschlossen) und nach Paraffin- oder Photoxylineinbettung schneiden. Oder man färbt die Schnitte mit Alaunkarmin (VII 6, 9 a), Alaunhämatoxylin (VII 12, 14, 18, 19), Safranin nach BABES (VII 24), Bismarckbraun (VII 29), Karmin-Hämatoxylin, Eosin-Hämatoxylin, Orange G-Hämatein (VII 33, 43, 44).

Will man aber Detailstudien vornehmen, namentlich das Schicksal des *Keimbläschens* verfolgen, dann genügen die vorstehend erwähnten, mehr indifferenten Färbungsmethoden nicht. Die Schnitte von Material, das in FLEMMING'scher Lösung fixiert war, werden mit Safranin-Gentiana nach FLEMMING oder HERMANN, mit Safranin-Lichtgrün, nach FLEMMING's Orangeverfahren oder mit PAL's Hämatoxylin und nachfolgendem Safranin gefärbt (VII 47, 48, 49, 54, 61). Eventuell dürfte hier auch die von *mir* empfohlene adjektive Verwendung der Aniline (VII 62) am Platze sein. Gute Resultate gibt auch BENDA's Kupferhämatoxylin (VII 58). Schnitte, die von anders fixiertem Materiale gemacht wurden, färbt man mit guter Aussicht auf Erfolg in adjektiver Weise mit Hämatoxylin. Unter den Hämatoxylinlacken sind am geeignetsten R. HEIDENHAIN's Hämatoxylinlack und BENDA's Eisenhämatoxylin (VII 55, 57), während M. HEIDENHAIN's Eisenhämatoxylin ganz unzuverlässig ist. Die Entfärbung bei letzterer Methode, die in bald stärkerer bald schwächerer Weise vorgenommen werden kann, gibt gar keine Gewähr dafür, dafs das gefärbt zurückbleibende Bild wirklich *Alles* zeigt.

Die *Nerven des Ovarium* ist empfohlen worden mit der GOLGI'schen schnellen Chromsilbermethode (VIII 11, 13, 14) oder mit der vitalen Methylenblaumethode (VII γ) darzustellen. Wenn man die nach solchen Präparaten gezeichneten Figuren der Autoren betrachtet, dann wundert man sich nur darüber, dafs neben den Nervenfasern auch noch die Eier im Ovarium Platz haben.

b) **Die Ausführungswege.** *Tuben, Uterus* und *Vagina fixiert* man wie den Darmkanal und färbt am besten auch mit den für den Darm angegebenen Methoden. Will man die *Muskelfasern* isolieren, so verfährt man nach den für die glatten Muskeln (cf. daselbst) gegebenen Vorschriften.

Die äussere Scham wird wie die Haut, die *Clitoris* wie der Penis behandelt (cf. daselbst); über die Darstellung der *Wollustkörperchen* soll beim peripheren Nervensysteme das Nötige gesagt werden. Die BARTHOLINI'schen *Drüsen* werden wie die grofsen Verdauungsdrüsen (Pankreas etc.) zur Untersuchung hergerichtet.

c) *Die Milchdrüsen.* Je nachdem man es mit Individuen zur Zeit der Trächtigkeit, der Lactation, der Funktionspause oder der noch nicht eingetretenen Geschlechtsreife zu thun hat, trifft man natürlich ein ganz verschiedenes Verhalten der Milchdrüsen an. Im allgemeinen aber wird die zur genauen Untersuchung der Organe nötige Fixierung

für die verschiedenen Zustände die gleiche sein können und sie wird die gleiche sein müssen, wenn man an derselben Tierspezies Vergleiche anstellen will. Zur Fixierung eignen sich Alkohol absolutus, MÜLLER'sche Flüssigkeit, FLEMMING'sche Lösung, Pikrinsalpetersäure (IV 1, 8, 21, 35). In den letzteren beiden Reagentien werden die Organe mindestens 24 Stunden verweilen müssen; häufig wird aber eine Verlängerung der Einwirkungsdauer nötig sein, in welchem Mafse, mufs Jeden die eigne Erfahrung lehren, Regeln lassen sich dafür nicht aufstellen. Zu *widerraten* sind als Fixierungsflüssigkeiten die stark Salpetersäure haltigen Gemische, wie PERÉNYI'sche Flüssigkeit, die BENDA'sche Methode. Präparate aus FLEMMING'scher Lösung wird man mit Fuchsin, Safranin, Gentiana oder Safranin-Gentiana färben (VII 21, 23, 24, 27, 47, 48); für Schnitte aus den anderen Fixierungsflüssigkeiten sind als Färbemittel empfehlenswert Karmin-Hämatoxylin, Pikrokarmin, Eosin-Hämatoxylin, Orange G-Hämatein (VII 33, 35, 36, 43, 44).

d) **Placenta und Eihüllen.** Durch starkes Schütteln in Wasser kann man die dendritisch verästigten Zotten der Placenta foetalis darstellen; nach Färben derselben in Pikrokarmin (VII 35, 36) kann man Präparate erhalten, die in Glycerin sich dauernd aufbewahren lassen. Zur *Fixierung*, die besonders für das Studium der Placentaentwickelung unerläfslich ist, wende man MÜLLER'sche Flüssigkeit, FOÀ'sche Lösung oder Sublimat an (III 8, 11, 39) und färbe die vom celloidinierten oder paraffinierten Materiale angefertigten Schnitte in Pikrokarmin, Orange G-Hämatein oder Eosin-Methylblau (VII 35, 36, 44, 46). Die letztere Farbenkombination dürfte darum von grofsem Vorteil sein, weil durch dieselbe die Gefäfse spezifisch gefärbt hervortreten.

Die *Eihüllen* behandelt man entweder wie geformtes Bindegewebe (cf. daselbst) oder macht Schnitte nach beliebiger Fixierung. Die Färbung kann nach Geschmack ausgewählt werden.

β) Männliche Geschlechtsorgane.

a) **Hoden.** Die Hoden *aller Tiere* zeigen ein ganz verschiedenes Verhalten, je nachdem sie in Funktion sind oder eine Funktionspause vorhanden ist. Auch beim *Menschen* kommen solche Funktionspausen vor. Bei *wirbellosen Tieren* erscheinen die Hoden in wahrnehmbarer Gestalt zuweilen nur während der Fortpflanzungsperiode, während sie aufserhalb derselben nicht sichtbar sind. Die folgend angegebenen Methoden beziehen sich auf den *Hoden der Vertebraten*, doch können sie auch für die gleichen Organe der *Evertebraten* gelten. Bei den *Gonaden der Hydromedusen* haben mir KLEINENBERG'sche Flüssigkeit und Sublimat sehr gute Dienste geleistet (III 32, 39).

Zur *Fixierung von Vertebraten-Hoden*, gleichgiltig ob man eine Funktionspause vor sich hat oder lebhafte *Spermatogenese* erwarten darf, sind meines Erachtens nur geeignet die BENDA'sche Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode, die FLEMMING'sche Lösung, die von *mir* hier zuerst empfohlene Chrompikrinsalpetersäure und die HERMANN'sche Lösung (III 15, 21, 36, 50). Man kann denjenigen Fixierungsmitteln, welche Osmiumsäure enthalten, eine Nachbehandlung mit Holzessig oder Tannin (III 26, 28) folgen lassen und braucht dann nicht zu färben. Hoden von kleineren Wirbeltieren (*Amphibien, Reptilien*) bringt man am besten unzerkleinert in die Fixierungsflüssigkeit, durch

die Zerkleinerung wird kein Vorteil erreicht, leicht vielmehr kann durch die dabei unvermeidliche Quetschung Schaden angerichtet werden. *Säugetierhoden, Krebshoden, Fischhoden* dagegen mufs man in Stücke von *höchstens* 1 cm. Seite zerlegen. Es wird in Paraffin oder Photoxylin (Celloidin) eingeschlossen. Zur Färbung sind nur geeignet Safranin-Gentiana nach Flemming oder Hermann (VII 47, 48), Safranin-Lichtgrün (VII 49), Benda's Kupferhämatoxylin (VII 58) und meine adjektive Verwendung der Aniline (VII 62). Heidenhain's Eisenhämatoxylin kann gelegentlich ganz brauchbare Bilder liefern (VII 56 a), doch entstehen zu leicht Eisenniederschläge, die das Präparat verderben.

Die *Spermatosomen* kann man *frisch* untersuchen und so ihre Bewegung studieren, wenn man bei *Säugern* den *Nebenhoden* anschneidet und die Flüssigkeit in etwas physiologische Kochsalzlösung auspreſst. Bei *Amphibien* zerschneidet man in einer Schale mit physiologischer Kochsalzlösung den Hoden mit einer Schere in kleine Partikelchen, die man noch obendrein zerquetscht. So bildet sich eine milchige Flüssigkeit, von der man einen Tropfen unter das Mikroskop bringt. In derselben beobachtet man die lebhaft sich bewegenden Spermatosomen. Will man *Dauerpräparate* derselben herstellen, so benutzt man die mit *Säugetiersamen* und auf die eben beschriebene Weise mit *Amphibiensamen* hergestellte Flüssigkeit. Man taucht in dieselbe einen Glasstab ein, den man über ein Deckglas wegstreicht, oder man bringt auf ein Deckglas einen Tropfen jener verdünnten Samenflüssigkeiten, deckt ein zweites Deckglas darauf und zieht schnell beide auseinander. Man verfährt also, wie bei einem Deckglastrockenpräparate von Blut. Dann läfst man die Präparate lufttrocken werden, bringt sie darauf in den zum Paraffinschmelzen erwärmten Wärmeschrank (60 °—62 ° C.) und läfst sie darin 2—4 Stunden, eventuell auch länger. Man färbt in Eosin-Hämatoxylin, Orange G-Hämatein oder in Gentianaviolett (VII 43, 44, 27) und hebt in üblicher Weise in Kanadabalsam auf. Um auf *Schnitten* die Spermatosomen untersuchen zu können, mufs man bei *Amphibien* Schnitte von Hoden anfertigen, die mit Samen gefüllt sind, während man bei *Säugern* solche durch den Nebenhoden macht. Letzteren kann man auch in Sublimat fixieren und färbt dann beliebig.

b) **Die ausführenden Wege.** Die *Epididymis* fixiert man in Pikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 35, 39) und färbt die Schnitte vom paraffinierten Materiale in Alaunkarmin, Alaunhämatoxylin oder Orange G-Hämatein (VII 6, 9 a, 12, 14, 18, 19, 44).

In gleicher Weise behandelt man das *Vas deferens*, die *Ductus ejaculatorii*, das Giraldès'sche *Organ*, die *Paradidymis*, das *Vas aberrans* Halleri und die Morgagni'sche *Hydatide*.

Den *Penis* härtet man in Alkohol oder Müller'scher Flüssigkeit (III 1, 8) und färbt die feucht oder von celloidiniertem Materiale hergestellten Querschnitte in ammoniakalischem Karmin oder Pikrokarmin (VII 1, 35, 36).

Prostata und Cowper'sche *Drüsen* verlangen dieselben Methoden der Fixierung und Färbung wie die Speicheldrüsen (cf. Kapitel VII dieses Abschnittes).

Anhang zu Kapitel IX.

Eier und Embryonen.

Frisch kann man sehr leicht die *Eier* von *Wirbellosen*, namentlich von *Echinodermen* und *Ascidien*, ohne weitere Vorbereitung untersuchen. Sind dieselben befruchtet, so lassen sich an diesen frischen Eiern auch sehr leicht die Entwickelungsstadien verfolgen.

Will man *Säugetiereier frisch* beobachten, so muſs man vorsichtig einen Graaf'schen Follikel anstechen und dessen Inhalt in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf einem Objektträger auffangen.

Eier von Amphibien und *Eier von Teleostiern* muſs man fixieren, um einen Einblick in dieselben zu erlangen, da sie nicht durchsichtig genug sind, um sie ohne weiteres studieren zu können. Zur Fixierung dürften am besten sein Flemming'sche Lösung, Pikrineisessig und Sublimateisessig (III 21, 31, 40). Dann müssen die Eier geschnitten werden, und zu dem Zwecke ist es notwendig, sie in Paraffin einzuschmelzen. Das ist bei *Amphibieneiern* darum nicht leicht, weil die Eihaut sehr schwer permeabel ist. Dieselbe verhindert auch ein schnelles Eindringen der Fixierungsflüssigkeiten, darum muſs man die Einwirkungsdauer der letzteren über das gewöhnliche Maſs bedeutend verlängern. van der Stricht empfiehlt z. B. *Tritoneneier* 5 Tage lang in Flemming'scher Lösung zu fixieren und man wird auszuprobieren haben, wie lange Pikrineisessig und Sublimateisessig bei Amphibieneiern einwirken müssen. Man darf nämlich nicht vergessen, daſs die Schleimmassen des Amphibienlaiches auſserordentlich schwer durchdringbar sind und daſs es nicht möglich sein dürfte, jedesmal die Eier erst aus der Schleimmasse herauszupräparieren.

Zur Entfernung der *Eihaut bei Amphibieneiern*, speziell bei *Froscheiern*, hat Blochmann folgendes Verfahren empfohlen. Die Eier werden in Flemming'scher Lösung fixiert, abgewaschen und in ein Becherglas eingebracht, in welchem ein Quantum Eau de Javelle (Liquor natri hypochlorosi) mit 3—4 fachen Volumen Wasser verdünnt sich befindet. Der *Laich* schwimmt oben auf. Man schüttelt nun von Zeit zu Zeit vorsichtig die Flüssigkeit mit dem Laich im Becherglase, damit die Eier mit immer frischen Partieen der Flüssigkeit in Berührung kommen. Nach 15—30 Minuten sind die *Gallertschicht und die Eihüllen* verschwunden, die Eier liegen am Boden des Becherglases. Jetzt muſs *sehr* vorsichtig, damit die Eier nicht verletzt werden, die verdünnte Lauge abgegossen werden, man wäscht dann sorgfältig die Eier in destilliertem Wasser und härtet in Alkohol, am besten im Dunkeln, von langsam steigender Konzentration. Die Methode ist für eben befruchtete Eier und für junge Embryonalstadien geeignet, bei weiter vorgeschrittener Entwickelung muſs man *vor der Fixierung* die Eihaut sprengen.

Die Eier von *Selachiern*, *Reptilien* und *Vögeln* sind durch die beträchtliche Entwickelung des Nahrungsdotters ausgezeichnet. Man muſs hier bei der Fixierung sehr vorsichtig verfahren, sonst zerstört man die Embryonen. Man übergieſst am besten die in der eröffneten Schale liegenden Eier — bei Vogeleiern entfernt man nach der Eröffnung den

weifsen Dotter — mit der Fixierungsflüssigkeit, und zwar ist Sublimat hier am besten (III 39). Nach einiger Zeit ist der Nahrungsdotter hinreichend hart geworden, sodafs man mit einem gebogenen Hornspatel den Embryo mit dem dicht unter ihm liegenden Dotter abheben und in der üblichen Weise weiter behandeln kann. Empfohlen zur Fixierung wird noch Platinchlorid (III 48). Beim Schneiden des brüchigen Nahrungsdotters mufs man die von v. Davidoff oder Heider empfohlenen Vorsichtsmafsregeln anwenden (V und VI).

Bei der Untersuchung von Embryonen ist *Stückfärbung* am geeignetsten, wenn nicht Zellteilungsformen studiert werden sollen, in welchem Falle man natürlich die Schnittfärbung vorziehen und bei derselben die Methoden verwenden wird, die im I. Kapitel dieses Abschnittes empfohlen wurden. Zur *Stückfärbung* eignen sich alkoholisches Boraxkarmin, Parakarmin, Alauncochenille, Kleinenberg'sches Hämatoxylin, Mayer's Hämacalcium und Eosin-Hämatoxylin nach Renaut (VII 4, 10, 11, 17, 20, 42).

Bei *morphogenetischen* Studien sind von aufserordentlicher Wichtigkeit die Methoden der plastischen Rekonstruktion (XI 6).

2. Gruppe der animalen Systeme.*)

Kap. X. Zentrales Nervensystem.

Die *Isolation der Ganglienzellen des Rückenmarkes* wird heutigen Tages, wo man das Heil nur vom Schneiden und Färben erwartet, in viel zu geringem Mafse vorgenommen. Es ist zuzugeben, dafs Isolationspräparate allein niemals *definitive* Aufschlüsse geben können, aber *zur Kontrole* der Schnittbilder sind sie meines Erachtens gerade dann, wenn es sich um Erkenntnis des Verhaltens der Ganglienzellen handelt, unerläfslich. In erster Linie stehen unter den zur Isolation der *polyklonen Ganglienzellen des Rückenmarks* geeigneten Methoden die von Deiters benutzten dünnen Lösungen von Kali bichromicum (II 10, 11), von denen die erstere auch für die Purkinje'schen *Zellen des Cerebellum* geeignet ist. Die Isolation der Ganglienzellen der *Oliven* und der *Grosshirnrinde* bietet dagegen grofse Schwierigkeiten und ich wüfste kein Reagens zu empfehlen, das wirklich sicher wirkt und brauchbare Resultate liefert. Man kann vor dem Zerzupfen in Pikrokarmin färben.

Eine besondere Methodik verwendet beim *Rückenmark der Amphibien* Lavdowsky. Er mazeriert entweder in $^1/_3$ Alkohol oder in Landois-Gierke's Flüssigkeit (II 1, 8). Zu 10 ccm. von beiden Reagentien setzt er 5—10 Tropfen einer 1 % wässrigen Lösung von Magdalarot oder einer 0,5 %—1 % wässrigen Lösung von Methylblau II. Beim $^1/_3$ Alkohol kommt der Farbstoff in die Mazerationsflüssigkeit, bei Landois-Gierke's Flüssigkeit wird erst nach beendeter Mazeration und nach zweimaligem Waschen gefärbt. Hat man in $^1/_3$ Alkohol + Magdalarot mazeriert, dann mufs man beim Zerzupfen, das in der Mazerationsflüssigkeit vorzunehmen ist, 1 Tropfen einer 0,5 % Osmiumsäurelösung auf den Objektträger während des Zerzupfens bringen. Saugt man die Zupfflüssigkeit

*) Das Bewegungssystem soll hier nicht besonders besprochen werden, da Knochen und Muskeln bei den Geweben (Kap. II u. III dieses Abschnittes) bereits ihre Erledigung gefunden haben.

schonend ab, so kann man in Kanadabalsam einschliefsen. Methylblau II-Präparate können mit Fuchsin oder Safranin nachgefärbt werden, wodurch man prächtige Bilder erhält.

Zur Isolation der zelligen Elemente des *Zentralnervensystems wirbelloser Tiere* sind zu empfehlen $^1/_6$ Alkohol, $^1/_4$ Alkohol, die Buchholz'sche Methode, 0,1 % Kali bichromicum-Lösung und verdünnte Pikrinsäurelösung (II 2, 3, 5, 10, 17). Auch hier kann man nach beendeter Mazeration in Pikrokarmin (VII 35, 36) nachfärben und nach Auswaschen in verdünntem Glycerin zerzupfen; solche Präparate lassen sich aufheben.

An die Stelle der Zupfpräparate ist in neuester Zeit die schnelle Golgi'sche Methode mit ihren Modifikationen getreten (VIII 11, 12, 13, 14), während die langsame Methode von Golgi (VIII 15) sich nicht hat einbürgern können. Die Methoden, um die es sich hier handelt und die in Kap. VIII Abschnitt I beschrieben sind, färben oder imprägnieren nämlich nicht *alle* Zellen gangliöser oder neurogliöser Natur im Zentralnervensystem, sondern immer nur wenige und in demselben Objekte nicht immer dieselben. Man findet daher auf den einzelnen Schnitten ein Paar Ganglienzellen durch ihre dunkelschwarze oder braunschwarze Färbung von der meist gelblichen Grundsubstanz scharf abstechen und so die Ausläufer der Zellen in oft erstaunlicher Weise in einer Ausdehnung mit dem Chromsilber imprägniert und daher deutlich gemacht, wie dies an gewöhnlich gefärbten Schnitten niemals, an Zupfpräparaten nur äusserst selten der Fall ist. Dieser Umstand verbunden mit dem Vorteil, schnell zu relativ guten Präparaten gelangen zu können, erklärt die Begeisterung für die Methodik, mit welcher die kritische Würdigung der Resultate, wie mir scheinen will, nicht immer gleichen Schritt gehalten hat.

Indem bezüglich der Methoden auf das in Kap. VIII des I. Abschnittes Gesagte hingewiesen wird, sollen hier die für die speziellen Untersuchungszwecke des Zentralnervensystems empfohlenen Modifikationen angeführt und einige Regeln gegeben werden, welche dem Anfänger das Gelingen der Arbeit erleichtern sollen, aber nicht garantieren können. Denn die Chromsilbermethode ist womöglich noch launenhafter als die übrigen Methoden der Metallimprägnation.

Nach van Gehuchten thut man gut zu dem Silberbade der Cajal'schen Modifikation (VIII 13) auf je 100 ccm. der Lösung 1 Tropfen Ameisensäure zu setzen. Der Aufenthalt der Objekte im Silberbade dauert 24 Stunden; sollen sie länger in demselben verweilen, so mufs man im Dunkeln aufheben. Als Resultat erhält man eine sehr schwarze Zeichnung der Zellen.

Ramón y Cajal bemerkt, dafs bei jungen Säugetieren und bei Embryonen das verschiedene Alter von verschiedenem Einflusse auf die Erzielung guter Bilder ist. Zur Färbung der *Molekularschicht des Kleinhirns* müssen die Objekte 5 Tage bei 25°—26° C. im Thermostaten im Silberbade verweilen; für die Darstellung der Collateralen ist ein Aufenthalt von 6—7 Tagen bei gleicher Temperatur erforderlich. Die Stücke dürfen nur 0,5 cm. dick sein und auf jedes müssen 25—30 ccm. Flüssigkeit kommen.

Bringt man die Stücke des in Müller'scher Flüssigkeit allein oder in Kali bichromicum-Osmiumsäure gehärteten Zentralnervensystems direkt in die $^3/_4$ % Silberlösung, so entsteht sofort auf der

ganzen Peripherie derselben ein Niederschlag von Chromsilber, welcher das weitere Eindringen von Silber ins Innere des Objektes unmöglich macht. Zu gleicher Zeit trübt sich, ebenfalls durch Bildung von Chromsilber, das Silberbad derart, dafs es ganz unbrauchbar wird. Diesem Übelstande kann man nicht entgehen dadurch, dafs man die Stücke in Wasser auswäscht; das mufs durchaus vermieden werden, weil sonst keine Chromsilberbildung erfolgt. Man mufs sich daher folgendermafsen helfen. Man bringt die fixierten Objekte in eine Glasschale mit Wasser, welchem nur wenige Tropfen der $^3/_4$ % Argentum nitricum-Lösung beigemischt sind. Noch ehe eine Trübung sich zeigt, wird in eine Schale Wasser mit reichlicherem Silberzusatz und nach wenigen Minuten in eine Lösung von halb Wasser + halb $^3/_4$ % Argentum nitricum und wiederum nach wenigen Minuten in das definitive Silberbad übergeführt. Vermeidet man auch nicht vollständig die Bildung von krystallinischen Niederschlägen an der Peripherie des Objektes, so sind dieselben wenigstens nicht so massenhaft, wie bei dem direkten Übertragen in das definitive Bad.

Die versilberten Objekte dürfen nicht gewaschen werden, sonst löst sich der Silberniederschlag. Man bringt daher nach beendeter Reduktion die Objekte auf $^1/_2$—1 Stunde in 50 % Alkohol, dann auf 1—2 Stunden in absoluten Alkohol, dann sofort auf 1—2 Stunden in Celloidin oder Photoxylin, klebt auf und schneidet nach dem Erhärten. Die Schnitte werden vom Messer direkt in Kreosot übertragen, in dem sie sich aufhellen; das Kreosot wird durch Terpentinöl ausgetrieben und aus diesem kommen sie in Dammarlack. *Sie dürfen nicht mit einem Deckglase eingedeckt werden*, weil sonst die Versilberung schwindet.

Um dennoch Deckgläser anwenden zu können und so die Aufhebung der Präparate zu erleichtern, hat Obregia nach Analogie des Tonfixierbades der Photographen eine Methode ersonnen, die in folgendem geschildert werden soll. Dieselbe gelingt übrigens nicht immer und da sie gelegentlich sehr gute — im Sinne der Golgi'schen Methode „gute“ — Präparate vernichten kann, so wird man es sich überlegen müssen, ob man dieselbe anwenden soll oder nicht; notwendig ist sie nicht. Die Methode von Obregia zur *Fixierung von* Golgi-*Präparaten* ist die folgende: Die Schnitte, die hierbei nicht in Kreosot, sondern in absoluten Alkohol vom Messer übergeführt werden müssen, kommen zunächst in ein Goldbad, das $^1/_2$ Stunde vor dem Gebrauche bereitet wird und dem weifsen Lichte ausgesetzt sein mufs: 1 % Goldchloridlösung (wässrig) 8—10 Tropfen, Alkohol absolutus 10 ccm. Unmittelbar nach Einlegen der Schnitte in dieses Bad — und unmittelbar kann auch die Zerstörung beginnen — Einbringen ins Dunkle, in welchem die Schnitte je nach ihrer Dicke 15—30 Minuten verweilen. Dabei wird das Silber durch Gold ersetzt. Dann kommen die Schnitte rasch in 50 % Alkohol, nach wenigen Minuten in Aqua destillata und wiederum nach wenigen Minuten in folgendes Bad: Unterschwefligsaures Natron (krystallisiert) 10,0, Aqua destillata 100,0. Hierin bleiben sie je nach ihrer Dicke 5—10 Minuten, aber ja nicht länger. Dann wird in destilliertem Wasser gut abgespült, in Alkohol absolutus gebracht, dann Kreosot, Terpentinöl, dicker Dammarlack und *Eindecken mit einem Deckglase*. Man kann vor dem Kreosot in Karmin, Hämatoxylin, Weigert oder Pal nachfärben.

Um Golgi-Präparate in *Paraffin einschmelzen* zu können, empfiehlt Sehrwald alle zur Paraffinierung nötigen Reagentien (Alkohol, Xylol

bez. Chloroform, Paraffin) mit Chromsilber zu übersättigen und diese Sättigung bei Erwärmung der betreffenden Reagentien vorzunehmen.

Die Resultate der Golgi'schen Methode bez. deren Modifikationen sind, wie schon bemerkt, eine Schwärzung der Zellen und ihrer Ausläufer (Ganglienzellen und Gliazellen) und der Axenzylinder. Man unterscheidet an Golgi-Präparaten die Protoplasmafortsätze von den Nervenfortsätzen dadurch, dafs erstere einen unebenen, rauhen, letztere einen glatten Kontur haben.

Ein besonderes Verfahren hat Lavdowsky bei seinen Untersuchungen befolgt. Er verwendet zur Silber- oder Sublimatimprägnation (VIII 15) Müller'sche Lösung, die er dadurch verstärkt, dafs er auf je 100 ccm. Wasser 3—3½ gr. Kali bichromicum und 1 gr. Natron sulfuricum hinzu nimmt. Er setzt zu je 20 ccm. dieser Lösung 2—4 ccm. 1 % Osmiumsäure und imprägniert im Laufe von 24—48 Stunden in 1 % Lösung von Argentum nitricum bei 20°—30° C. Die imprägnierten Stücke kommen sofort in 95 % Alkohol. Die Schnitte werden nachgefärbt und zwar bringt er sie in eine alkoholisch-wässrige Lösung von Magdalarot, in welcher die Färbung fast augenblicklich erfolgt. Nun werden sie gebeizt, indem sie für einige Sekunden bis 1 Minute in 5 ccm. Wasser eingebracht werden, dem 3—6 Tropfen 1% Chlorgoldlösung beigefügt sind. Übrigens sind gute Doppelfärbungen selten.

Statt in Kreosot-Terpentin aufzuhellen bringt Lavdowsky direkt in einen Resina-Sandara-Lack ein. Er stellt 2 Konzentrationsgrade desselben her. Zunächst werden 25—30 gr. reinsten Sandarakharzes in 40—50 ccm. absoluten Alkohols gelöst. Diese Lösung ist Lack II. Ein Teil dieser Lösung wird mit einem Teile absoluten Alkohols verdünnt = Lack I. Der Schnitt wird mit einem biegsamen Spatel aus dem Alkohol direkt auf den Objektträger gebracht. Wenn der Alkohol fast ganz verdunstet ist, wird mit Lack I übergossen. Man läfst den Objektträger horizontal bei Zimmertemperatur liegen. Ist der Lack flach ausgebreitet und eben eingedickt (wobei schon eine Untersuchung mit schwachen Linsen möglich ist), so übergiefst man mit Lack II, den man mit einem dicken Glasstabe schonend ausbreitet. Die Objektträger bleiben flach liegen. *In feuchter Luft hellt der Lack schwer auf.* Nach ¼—¾ Stunden sind die Schnitte fertig. Sprünge im Lack werden durch Übergiefsen mit sehr dünnflüssigem, in Benzin gelöstem Dammarlack oder Kanadabalsam verhütet. Darauf werden die Objektträger für 1 Tag horizontal im Wärmeschranken aufbewahrt.

Die vorstehend geschilderten Methoden ermöglichen nur das Studium der Ganglien- bez. Gliazellen und der Nervenfasern, geben aber über den topographischen Aufbau des Zentralnervensystems wenig oder gar keinen Aufschlufs und lassen auch eine Erkennung feinerer Strukturen der Ganglienzellen nicht zu. Zu ersterem Zwecke mufs man Gehirn und Rückenmark in toto härten, nach der von Stilling eingeführten Methode in kontinuierliche Schnittserien zerlegen und die Schnitte geeignet färben.

Zur *Härtung* ist noch immer am besten geeignet die Müller'sche Lösung (III 8); nur dauert es Monate, bevor *Säugetiergehirne* bez. *Rückenmark* in ihr die nötige Schnittkonsistenz erhält. Man kann die Härtung beschleunigen und die Fixierung verbessern, wenn man zunächst von beiden *Carotides communes* (beim Säugetier) aus mit 0,75 % Kochsalzlösung die Gehirngefäfse ausspritzt, dann mit Müller'scher Flüssig-

keit nachspritzt, nun das *Gehirn* aus der Schädelkapsel nimmt und in Müller'scher Lösung weiter härtet. Ebenso *muss* man verfahren, wenn man ein Gehirn in toto in Sublimat (III 39) fixieren will, da diese Flüssigkeit sonst nicht eindringt. Sublimatpräparate kann man in Paraffin einschmelzen — natürlich nur kleine Stücke vom Gehirn —, Müller-Präparate bettet man in Celloidin bez. Photoxylin ein oder schneidet in der Gudden'schen Masse (V 3). Die vielfach empfohlene Erlicki'sche Flüssigkeit (III 9) soll Zellschrumpfungen verursachen. *Rückenmark* zerschneidet man stets in etwa 1 cm. grofse Stücke und härtet es in Müller'scher Lösung; läfst man dasselbe in der Dura mater, die man nur dorsalwärts aufgeschnitten hat, so kann man die einzelnen Stücke in ihrer Reihenfolge erhalten, da sie an der Dura durch die Nervenwurzeln festhaften und es somit möglich ist, ein ganzes zerschnittenes Rückenmark auf einmal zu härten, ohne eine Durcheinanderwerfung der Stücke befürchten zu müssen. Handelt es sich um pathologisches Material (Systemdegenerationen etc.), so kann es nötig sein, die Stücke gröfser als 1 cm. zu machen.

Zur *Färbung* von Müller-Präparaten verwendet man mit Vorteil ammoniakalisches Karmin (VII 1). Man nimmt von der Stammflüssigkeit wenige Tropfen, die man mit soviel destilliertem Wasser verdünnt, dafs die Lösung durchsichtig wird. In dieselbe kommen die Schnitte und bleiben darin Tage und Wochen, bis sie ein kirschrotes Aussehen erlangt haben. Dann werden sie in Wasser, das mit etwas Essigsäure angesäuert ist, ausgewaschen und auf die übliche Weise in Kanadabalsam eingeschlossen. Gefärbt ist alles bis auf das Nervenmark; die Teile treten aber ziemlich scharf differenziert hervor. Man kann die Färbung beschleunigen, wenn man die Schale mit der Farbflüssigkeit und den Schnitten auf die Decke des Paraffinofens stellt. Das ammoniakalische Karmin ist noch immer *das beste Färbemittel für Axenzylinder*. Auch Karmin-Hämatoxylin nach Fritsch (VII 33) ist empfehlenswert; diese Methode hat den Vorzug schnell zu färben, liefert aber keine so distinkte Tinktion wie das ammoniakalische Karmin. Auch Urankarmin (VII 8) soll an Rückenmarksschnitten von Müller-Präparaten gute Axenzylinderfärbung geben. Hat man nach Benda in Salpetersäure-Kali bichromicum (III 15) gehärtet, so ist mit Vorteil Benda's Eisenhämatoxylinlack zu verwenden (VII 55). Nach Härtung in Alkohol absolutus kann man die Nissl'sche Fuchsinfärbung erfolgreich verwenden (VII 22).

Das *Studium des Faserverlaufes* im Zentralnervensystem ermöglichen die Weigert'sche Säurefuchsinmethode, die Weigert'sche und die Pal'sche Hämatoxylinmethode (VII 25, 59, 60). Namentlich die letzteren beiden Methoden liefern ganz ausgezeichnete Resultate. Handelt es sich um Systemerkrankungen, bei denen in den affizierten Systemen das Nervenmark ausgefallen ist, so sind sie durch keine andere Methode zu ersetzen, da keine andere so exakte, durchaus zuverlässige Resultate liefert. Die von den Gehirnpathologen gegenwärtig vielfach angewandte Marchi'sche Methode (VII 27) gibt nach dem, was ich davon gesehen habe, lange nicht so klare und unzweideutige Bilder wie die Weigert'sche und die Pal'sche Methode. Die beiden letzteren färben nur das Nervenmark (daher bei Evertebraten nicht verwendbar); da dies an den pathologischen Stellen ganz oder fast ganz ausgefallen ist, so kann man durch Vergleichung der gesunden und kranken Seite den Faserverlauf eruieren.

Systemerkrankungen kann man nach dem Vorgange Gudden's auch experimentell herbeiführen. Entweder man zerstört das Endorgan eines Nerven bei einem neugeborenen Tiere, dann erhält man, wenn man nach mehreren Wochen bis Monaten tödtet, eine *aufsteigende Degeneration;* oder man zerstört zentral (Hirnrinde oder Hirnganglien) und beobachtet nach mehr oder minder langer Zeit *absteigende Degeneration.* In beiden Fällen liefern, wie gesagt, die Weigert'sche und die Pal'sche Methode die exaktesten Resultate.

Eine Modifikation der Weigert'schen Methode ist die Kultschitzky'sche *Hämatoxylinmethode:* In eine Mischung von 20 ccm. einer gesättigten Borsäurelösung und 80 ccm. destillierten Wassers gießt man 1 gr. in einer geringen Quantität absoluten Alkohols gelösten Hämatoxylins. Die Lösung braucht 2—3 Wochen zum Ausreifen und ist dann erst brauchbar. Bei Verwendung von 0,25 gr. Hämatein statt 1 gr. Hämatoxylin würde sie sofort gebraucht werden können. Vor der Anwendung thut man 2—3 Tropfen Essigsäure in ein Uhrschälchen voll dieser Lösung. Die von celloidiniertem Materiale angefertigten Schnitte bleiben in der Lösung 18—24 Stunden, dann Abwaschen in Alkohol. Die markhaltigen Nerven sind ausschließlich und zwar blau gefärbt, alles übrige fast farblos oder leicht gelblich. Bedingung für das Gelingen der Färbung ist die Ansäuerung mit Essigsäure. — *Noch einfacher* ist die folgende Modifikation desselben Autors, die den gleichen Effekt haben soll. 2 % Essigsäure 100 ccm., Hämatoxylin, in einer kleinen Quantität absoluten Alkohols gelöst, 1 gr. Diese Mischung braucht *sehr* lange Zeit zum Ausreifen. (Auch hier würde die Verwendung von Hämatein die sofortige Benutzbarkeit herbeiführen.) Darin Färben bis 24 Stunden, Auswaschen in Alkohol.

Ich habe seit einiger Zeit folgende Methode angewandt, die mir zur makroskopischen Demonstration des Faserverlaufes sehr gute Bilder geliefert hat und die vielleicht da, *wo es sich nicht um feinere Verhältnisse handelt*, sondern um grobe Darstellung, ganz gute Dienste leisten kann. Schnitte von Müller-Präparaten, gleichgiltig ob letztere in Photoxylin bez. Celloidin eingebettet waren oder nach bloßer Umrandung geschnitten wurden, kommen auf 24 Stunden in eine Mischung von 5 Teilen Müller'sche Lösung + 1 Teil 1 % Osmiumsäurelösung. Dann wird in Wasser ausgewaschen, für 24 Stunden in 20 % Tanninlösung übergeführt, gut ausgewaschen und auf gewöhnliche Weise in Kanadabalsam eingeschlossen. *Resultat*: Schwärzung aller markhaltigen Nervenfasern, alles übrige ungefärbt.

Es mögen noch einige *Spezialmethoden* hier Platz finden, welche eine weitere Verbreitung bisher nicht erfahren haben.

Berkley fixiert Stücke von Zentralnervensystem 24—30 Stunden bei 25° C. in Flemming'scher Lösung (III 21), bringt dieselben ohne Auswaschen direkt in absoluten Alkohol, der in 24 Stunden zwei Mal gewechselt wird und bettet in Celloidin ein. Die sehr dünnen Schnitte kommen zunächst in Wasser, dann über Nacht in eine gesättigte wässrige Kupferacetatlösung oder man erwärmt 25—30 Minuten in der Lösung auf 35°—40° C. Dann wird (nach dem Erkalten) in Wasser ausgewaschen und in einer folgenderweise hergestellten Hämatoxylinlösung gefärbt: 50 ccm. Wasser werden einige Minuten gründlich gekocht, dazu 2 ccm. gesättigter wässriger Lösung von Lithion carbonicum gefügt, das ganze 1 Minute gekocht, dann 1,5—2 ccm. einer 1 % Lösung von

Hämatoxylin in absolutem Alkohol zugefügt, die Flasche geschüttelt, verkorkt und abkühlen gelassen. Die Schnitte bleiben in dieser Lösung 15—20 Minuten auf dem Wasserbade bei 40° C., werden nach dem Abkühlen gründlich gewaschen und nach der Weigert'schen Methode (VII 59) entfärbt, was 1—3 Minuten dauert. Dann gründlich Waschen, Alkohol, Bergamottöl, Kanadabalsam.

Monti härtet Hirnteile in Kalium bichromat oder Müller'scher Lösung länger als Golgi (VIII 11), beschleunigt aber den Härtungsprozefs nicht durch höhere Temperatur. Dann härtet er in einem Gemisch von Müller'scher Lösung und 20 % Kupfersulfatlösung zu gleichen Teilen nach. Es beginnt eine Bräunung des Gewebes schon nach 24 Stunden. Nur gewisse Teile im Nervensystem werden gefärbt und nicht in jedem Stücke gleichmäfsig. Am besten zur Demonstration von Nervenfasern und Gliazellen.

Ziehen legt frisches Zentralnervensystem in eine Mischung von gleichen Teilen 1 % Goldchloridlösung und 1 % Sublimatlösung für mindestens 3 Wochen bis zu 5 Monaten. Die Stücke werden metallisch rotbraun. Man klebt auf Kork auf und schneidet ohne Einbettung. Die Schnitte kommen in verdünnte Lügol'sche Lösung (VII C) 1 : 4, je nach ihrer Dicke verschieden lange. Gründlich Auswaschen, Montieren. Keine Metallinstrumente aufser dem Messer zum Schneiden. *Resultat*: Markhaltige und marklose Nerven, Ganglienzellen und Gliazellen blaugrau. Hat man vorher eine Chromhärtung vorgenommen, dann Einlegen in die obige Flüssigkeit, mit Jodjodkalium Differenzieren. Ganglienzellen hell, scharf begrenzt, Protoplasmafortsätze deutlich hervortretend mit schwarzem Färbungsbelag.

Zur Darstellung des *neurogliösen Gewebes* kann man sich der eingangs dieses Kapitels empfohlenen Isolationsmethoden bedienen oder kann die Golgi'sche Chromsilberimprägnation anwenden. Eine spezielle Vorschrift zur *Färbung der Neuroglia* giebt nur die folgende Schaffer'sche *Methode.*

Die Schnitte von dem in Müller'scher Flüssigkeit gehärteten und dann celloidinierten Materiale werden zunächst nach der oben beschriebenen Kultschitzky'schen Hämatoxylinmethode gefärbt. Dann werden sie 24 Stunden in Aqua destillata ausgewaschen und bis zu 3 Wochen in schwacher wässriger Eosinlösung gefärbt. Es genügen von letzterer 2 Tropfen einer 1 % Lösung auf 10 ccm. Aqua destillata für 1—2 Schnitte. Je mehr Schnitte man nimmt, um so mehr Eosin mufs man nehmen, aber immer in dem angegebenen Verhältnisse. *Resultat*: Neuroglia rot, Gefäfse, Pia und deren Fortsätze braun, markhaltige Nerven schwarz.

Kap. XI. Peripheres Nervensystem.

a) **Die peripheren Ganglien.** Die peripheren gangliösen Anhäufungen, nämlich die *Spinalganglien*, die *sympathischen Ganglien* sowie die *Ganglien der Hirnnerven* (Trigeminus, Vagus) kann man, wenn dieselben nicht zu grofs sind, in toto unter das Mikroskop bringen und untersuchen. Am besten dürften sich dazu eignen die betreffenden Organe beim *Frosch*, beim *Salamander* und bei der *Eidechse.* Man bringt das dem eben getödteten Tiere entnommene Ganglion auf den

Objektträger in einen Tropfen 30 % Kalilauge, deckt mit einem Deckglase ein und komprimiert leicht. Dünnere oder stärkere Lauge zu nehmen mufs man sich hüten, da beide, besonders aber die dünne Lauge, sehr deletär wirken.

Indessen wird man auf diesem Wege nur unvollkommen den Bau der Ganglien und speziell das Verhalten der Ganglienzellen zu ihren Fortsätzen zu erkennen vermögen. Um letzteres zu eruieren, wird man mazerieren müssen. Die weitaus beste Methode zu diesem Zwecke, welche mir stets vortreffliche Resultate gegeben hat, sofern nur die bei jeder Mazeration zu beachtenden Regeln befolgt wurden, ist die Arnold'sche Methode (II 6), welche überdies den Vorteil bietet, dafs man mit Pikrokarmin nachfärben oder mit Goldchlorid (0,1 %—0,01 %) imprägnieren kann (II 6). Alle anderen Methoden sind unzuverlässig in ihren Wirkungen, doch wird Jeder gut thun, auch hier durch Anwendung von verdünntem Alkohol, verdünnter Chromsäure oder Osmiumsäure die für das jeweilige Objekt geeignete Mazerationsflüssigkeit sich selber auszuprobieren.

Wie das zentrale Nervensystem können auch die peripheren Ganglien mittels der Golgi'schen Methode untersucht werden (VIII 11—14). Aufserdem ist hier Ehrlich's vitale Methylenblaufärbung anwendbar (VII γ).

Zur Härtung und Färbung sind die Methoden brauchbar, die für das zentrale Nervensystem empfohlen wurden.

b) **Markhaltige Nervenfasern.** Um die markhaltigen Nerven im *lebenden Organismus* zu studieren, kann man die *Zunge und die Lunge* des curaresierten *Frosches* benutzen (I 2, 4). Namentlich das letztere Organ ist vermöge seiner Durchsichtigkeit besonders geeignet, da es die Anwendung stärkerer Linsensysteme gestattet.

Über den feineren Bau geben Zupf- und Schnittpräparate Aufschlufs. Am besten ist der *Ischiadicus des Frosches,* von dem ein höchstens 2 mm. langes, nicht zu dickes Stück in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung zerzupft wird. Bei gröfseren und voluminöseren Partieen gelingt das Zerzupfen in nur mäfsigem Grade. In der Kochsalzlösung kann man stundenlang die Nervenfasern beobachten und so alle Veränderungen, welche dieselbe beim Absterben erleiden, mit den Augen verfolgen. Statt der Kochsalzlösung kann man auch 0,1 % Osmiumsäure nehmen. Man bringt das dem eben getödteten Tiere entnommene Nervenstück auf einen Objektträger, giebt einen Tropfen der Osmiumlösung zu, entfernt mit den Nadeln schnell das Perineurium und zerzupft. Saugt man vorsichtig mit Filtrierpapier oder einer knieförmig gebogenen Pipette die Osmiumlösung ab, gibt etwas Wasser zu, ersetzt dies durch einen Tropfen verdünnten Glycerins (IX 1), so kann man nach Eindecken mit einem Deckglase und Umranden desselben Dauerpräparate herstellen, die sich lange Jahre halten. Will man keine Dauerpräparate anfertigen, so kann man in der Osmiumlösung zerzupfen, nur wird dann allmählich die Schwärzung sehr intensiv. Man kann aber auch so verfahren, dafs man das Nervenstück in ein Uhrglas mit 0,05—0,1 % Osmiumsäure bringt, schnell mit den Nadeln das Perineurium entfernt, weil dieses das gleichmäfsige Eindringen des Reagens verhindert, und über Nacht liegen läfst. Am anderen Tage spült man zunächst in destilliertem Wasser aus, zerzupft in letzterem

oder in verdünntem Glycerin. Glycerinpräparate lassen sich dauernd aufbewahren.

Will man die *Einwirkung der Reagentien* (Kochsalzlösung, Osmiumsäure, Silbernitrat) auf die Bestandteile der markhaltigen Nervenfaser Schritt vor Schritt verfolgen, so kann man den Nerven auf dem Objektträger ohne Zusatzflüssigkeit zerzupfen, dann deckt man ein, bringt unter das Mikroskop und sucht eine isoliert liegende Nervenfaser auf. Selbstverständlich müssen diese Manipulationen sehr schnell vorgenommen werden, damit das Präparat nicht eintrocknet. Hat man eine isolierte Faser aufgefunden, dann bringt man mit einer Pipette oder einem feinen Glasstabe einen Tropfen des Reagens, dessen Wirkung man studieren will, an den Rand des Deckglases. Der Tropfen verbreitet sich sehr schnell und man kann auch mit starken Linsen die weiteren Vorgänge beobachten.

Will man die *Myelinformen* sich zur Anschauung bringen, dann zerzupft man zunächst in physiologischer Kochsalzlösung, bringt an den einen Rand des Deckglases einen Tropfen destillierten Wassers, während man gleichzeitig am anderen Rande mit Filtrierpapierstückchen das Kochsalz absaugt. Der Wasserzusatz wird so oft wiederholt, wie dies notwendig ist, um unter dem Mikroskope die Verflüssigung des Nerveninhaltes zu beobachten.

An frischen Nerven den *Axenzylinder* darzustellen giebt es drei Methoden: die Anwendung von Kollodium, Äther oder Chloroform. Bei den ersteren beiden zerzupft man zunächst den Nerven auf einem Objektträger *ohne Zusatz,* tropft etwas Kollodium oder Äther auf das Präparat auf und deckt rasch ein. Die erhaltenen Bilder sind vorzüglich, nur leider schon nach wenigen Minuten durch Verdunstung des Reagens unbrauchbar. In Chloroform läfst man den Nerven über Nacht liegen und zerzupft am anderen Morgen in etwas Wasser.

Die Ranvier'schen *Einschnürungen* stellt man mittels Silbernitratlösung oder mit Fuchsinlösung dar. Man bringt ein Stückchen Froschischiadicus in eine 0,2 % Lösung von Argentum nitricum, zerreifst rasch das Perineurium und läfst einige Stunden liegen. Dann überträgt man in destilliertes Wasser, in welchem die Reduktion des Silbersalzes eintritt. Man zerzupft dann in Glycerin und kann dauernd aufbewahren. Bei Verwendung des Fuchsins verfuhr ich vor Jahren in folgender Weise: Man bringt 6—7 Tropfen einer 4 % alkoholischen Fuchsinlösung in ein Uhrschälchen mit destilliertem Wasser. Dahinein kommen die frischen Nerven auf 4—24 Stunden und werden dann ausgewaschen. Die Ranvier'sche Einschnürung tritt an Zupfpräparaten als dunkelbraunroter Ring plastisch hervor, der Axenzylinder ist tiefrot, das Mark (doppelter Kontur) hellrosa. Die Präparate sind nicht haltbar.

In der neuesten Zeit ist behauptet worden, dafs an den Lantermann'schen *Einkerbungen*, die ich wie schon in meiner ersten Publikation 1879 auch jetzt noch für Artefakte halte, besondere Struktureigentümlichkeiten vorhanden seien, sogenannte *Ringbänder.* Obgleich die Methoden nicht sehr Vertrauen erweckend sind, so gebe ich sie hier doch der Vollständigkeit halber wieder. Nach Johansson werden die Nerven *zur Darstellung der Ringbänder* in eine Mischung von 3 % Kali bichromicum und $^1/_2$ % Kupfersulfat eingebracht. Bei Brütofentemperatur (40° C.) wird 14 Tage gehärtet, dann in Wasser zerzupft und $^1/_2$—4 Stunden in folgender Hämatoxylinlösung gefärbt: $^1/_2$ % Alaunlösung 100 ccm. + 20 Tropfen 5 % alkoholischer Hämatoxylinlösung.

Zu ähnlichem Zwecke ist folgende Methode von SEGALL angegeben: Ein frischer Froschnerv wird schnell in einigen Tropfen 1 % Osmiumsäure zerzupft, bis der Nerv anfängt braun zu werden, dann wird sofort in destilliertem Wasser ausgewaschen und in 2 % Argentum nitricum-Lösung zerzupft. Hierin werden die Objekte 20 Minuten, ½ oder ¾ Stunden dem Lichte ausgesetzt, indem man den Nerven von Zeit zu Zeit bewegt. Dann wird in destilliertem Wasser abgewaschen und in Glycerin aufgehoben bez. zerzupft. Vor dem Zerzupfen in Glycerin kann noch in 1 % wässriger Eosinlösung, in neutralem Karmin (VII 33) oder Hämatoxylin gefärbt werden. Die Reduktion tritt nur an den RANVIER'schen Einschnürungen und den Spitzenlücken der LANTERMANN'schen Einkerbungen auf; RANVIER'sche Axenkreuze sind nicht zu beobachten.

Eine ausgezeichnete Isolation, ohne dafs ein genaues Zerzupfen notwendig ist, erhält man mit 1 % Osmiumsäure nach der Vorschrift von NEUMANN (II 14).

Um Schnitte anzufertigen, fixiert man am besten in MÜLLER'scher Lösung (III 8). Damit das Verkrümmen in der fixierenden Flüssigkeit vermieden wird, schiebt man unter den Nerven einen schmalen Holzstab, der etwas breiter als der Nerv sein mufs, und bindet auf demselben den Nerven an beiden Enden fest. Dann wirft man den Holzstab, das Objekt nach unten, in die Fixierungsflüssigkeit. Nach 8—10 Tagen wird direkt in 96 % Alkohol übergeführt, der häufig zu wechseln ist (Härtung im Dunkeln). Man färbt die Schnitte nach Paraffineinschmelzung in Pikrokarmin (VII 35, 36) oder färbt mit Pikrokarmin durch und schneidet erst dann das paraffinierte Objekt. Die Schnitte brauchen nicht zu dünn zu sein. Die Axenzylinder sind intensiv rot, das Mark farblos oder, wenn noch Pikrin im Präparate geblieben ist, gelb.

Nach STRÖBE erhält man auf folgende Weise gute Axenzylinderfärbung. Schnitte von MÜLLER-Präparaten kommen auf ½—1 Stunde in gesättigte wässrige Anilinblaulösung, werden in Wasser abgewaschen und in einem Alkohol differenziert, welcher 20—30 Tropfen Ätzkalialkohol enthält. (Letzterer wird so hergestellt, dafs 1 gr. Kali causticum fusum in 100 ccm. Alkohol absolutus gelöst und dafs von dieser Stammflüssigkeit die gewünschte Verdünnung hergestellt wird.) Die Anilinblaulösung darf nicht zu alt sein. Im Kalialkohol werden die Schnitte rotbraun. Die Differenzierung wird so lange fortgesetzt, bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. Jetzt spült man in Wasser ab, die Schnitte werden blau und man färbt in konzentrierter wässriger, halb mit Wasser verdünnter Safraninlösung ¼—½ Stunde. Ausziehen in Alkohol, Xylol, Balsam.

Um das *Axenzylindergerüst* darstellen zu können, fixiert man *Froschnerven* während 4 Stunden in ½ % Osmiumsäurelösung, nachdem man sie vorher auf einem Holzstäbchen befestigt hat, wie dies vorher geschildert wurde. Nach dem Fixieren wird gründlich, etwa 4 Stunden, in destilliertem Wasser ausgewaschen und in 90 % Alkohol für 24 Stunden übertragen. Erst dann ist der Nerv von seiner Unterlage zu lösen. Darauf färbt man in gesättigter wässriger Säurefuchsinlösung etwa 12 Stunden und wäscht in absolutem Alkohol aus. Man schneidet in Paraffin, doch dürfen die Nerven nicht zu lange (1 Tag) im Chloroform und Chloroformparaffin liegen. Nimmt man zur Durchtränkung Xylol, so darf man nur ½ Stunde in dem Reagens belassen, da dasselbe osmierte Fette (Nervenmark) löst. Die Schnitte müssen *sehr* dünn sein.

Osmierte Nerven kann man nach Key und Retzius in ammoniakalischem Karmin (VII 1) färben, wodurch man die Schwann'sche Scheide zur Anschauung bringt.

Gänzlich unbrauchbar zur Färbung der peripheren markhaltigen Faser ist Benda's Kupferhämatoxylinlack.

Zur Darstellung der *Hornscheiden* ist die Kühne'sche Verdauungsmethode anzuwenden (II 31).

c) **Marklose oder graue Fasern.** Dieselben untersucht man im *Sympathicus* des *Frosches*, in den Nerven der *Cyclostomen* (diese Tiere besitzen überhaupt keine markhaltigen Fasern) oder bei *Evertebraten* und hier am besten bei *Mollusken*. Entweder zerzupft man frisch in physiologischer Kochsalzlösung oder behandelt mit 0,1 %—1 % Osmiumsäurelösung 2—24 Stunden und färbt in Pikrokarmin nach (VII 35, 36), oder man bringt auf 2—4 Stunden in 0,1 % Goldchloridlösung, wäscht aus und reduziert in leicht mit Essigsäure angesäuertem Wasser.

d) **Nervenendigungen.** *α) Endigungen der motorischen Nerven.* Die Endigungen im *quergestreiften Muskel* werden am besten an Goldpräparaten studiert. Doch mufs man sich stets vergegenwärtigen, dafs die Goldmethode mindestens ebenso launisch ist wie die Silbermethode, dafs man daher in ganz unkontrolierbarer Weise gelungene und mifslungene Bilder erhält und weder weifs, wodurch in dem einen Falle das Gelingen, in dem anderen das Mifslingen verursacht worden ist. Am geeignetsten zur Erkennung der Nervenenden sind die Muskeln von *Reptilien* und *Säugern*, während die der übrigen Vertebratenklassen keine guten Resultate liefern. Die besten Goldmethoden sind die Löwitt'sche, Marinescu'sche und Golgi'sche Methode (VIII 3, 5, 7). Die Präparate können in Glycerin aufbewahrt werden, verderben aber leicht. Sandmann kann bei seiner Methode der Isolation der Muskelfibrillen (II 27) auch die Nervenendigungen noch vergolden, wie dies in II 27 des Abschnittes I beschrieben wurde. Aber man kann hier kein Detail mehr erkennen, wohl aber *die Zahl der Nervenendigungen an einer Muskelfibrille* feststellen.

W. Krause stellt die Nervenenden folgendermafsen dar. Er legt den Muskel in 0,01 % Schwefelsäure ein und erwärmt während 24 Stunden auf 35 ° C. Dadurch wird das Bindegewebe in Leim verwandelt. Nachher wird mit einer aufserordentlich dünnen Goldlösung (0,0006 % bis 0,0018 %) vergoldet. Die Muskeln müssen purpurfarben aussehen. Wenn die Präparate zu dunkel sind, wird nach der Methode von Mayer (IV 9) so lange entfärbt, bis der Purpurton erreicht ist.

Die Endigungen in den *glatten Muskeln* werden wie die in den quergestreiften dargestellt, aufserdem kann für diesen Zweck noch die vitale Methylenblaumethode (VII *γ*) verwendet werden.

β) **Endigungen der sensiblen Nerven.** Das Hauptreagens für die Darstellung der sensiblen Endigungen ist in der Gegenwart das Methylenblau nach Ehrlich (VII *γ*). Aufserdem können Vergoldungsmethoden angewendet werden und zwar die Cohnheim'sche, Hénocque'sche, Ranvier'sche, Flemming'sche und die Retzius'sche Methode (1, 2, 4, 6, 8). Für die Vater'schen Körperchen kann Osmiumsäure (0,1 %— 0,5 %) mit nachfolgender Färbung in Pikrokarmin (VII 35, 36) verwandt werden. Die Herbst'schen Körperchen erkennt man an

Schnittpräparaten durch die *Wachshaut des Entenschnabels*, die mit Osmiumsäure fixiert war.

Zur Erkennung der *Tastkolben* ist am besten die Untersuchung am lebenswarmen Objekte *ohne irgend einen Zusatz*. Bei Verwendung von Reagentien legt man die zu untersuchenden Organe in 8%—10% Natronlauge oder in 5% Salzsäure oder in 2%—3% Essigsäure oder käuflichen Essig für einen bis mehrere Tage oder endlich in 0,1% Osmiumsäure für 24 Stunden. Da für die verschiedenen Arten der Tastapparate die Methoden verschieden anzuwenden sind, so sei hier auf die Spezialarbeiten von W. Krause, welche von grundlegender Bedeutung für dieses Gebiet waren, sowie auf die von Merkel hingewiesen.

Kap. XII. Die Sinnesorgane.

a) Die Haut.

Die Untersuchung der *Hautdecke* geschieht am besten ausschliefslich an fixiertem Materiale. Am geeignetsten zur Fixierung sind absoluter Alkohol, Müller'sche Flüssigkeit, Flemming'sche Lösung, Pikrinsalpetersäure (III 1, 8, 21, 35). Auch Pikrinosmiumsalpetersäure (III 37) mit nachfolgender Holzessigbehandlung (III 26) liefert sehr gute und instruktive Bilder. Ganz zu vermeiden sind solche Fixierungsflüssigkeiten, welche eine starke Salpetersäure enthalten, da dieselbe die Epidermis loslöst. Man mufs bei Fixierung von Hautstücken auf zweierlei ganz besonders achten. Erstens verkrümmen sich kleine Hautstückchen im fixierenden Reagens ganz aufserordentlich, sodafs man dann jede Möglichkeit, das Objekt richtig zu orientieren, verliert. Mehr als bei jedem anderen Organe hat man daher vor dem Einbringen in das Reagens für eine ausreichende Befestigung auf starrer Unterlage zu sorgen. Zweitens durchtränkt sich die Haut sehr schwer, man mufs daher stets viel Flüssigkeit verwenden. Der gleiche Übelstand, das schwere Durchtränken, hat auch statt, wenn man in Paraffin einschmilzt. Ich kann für den letzteren Zweck nach meinen Erfahrungen nur raten, die Hautstückchen, ehe sie in Chloroformparaffin kommen, etwa 8 Tage in reinem Chloroform zu lassen, erst dann ist man sicher, dafs das Paraffin alle Schichten gleichmäfsig durchdringt. Auch mufs man die Haut von den unter ihr gelegenen Muskeln möglichst gründlich zu befreien suchen, die Muskeln durchtränken sich noch schwerer als die Haut, knirschen beim Schneiden in Paraffin, ruinieren häufig das Messer und bewirken dadurch, dafs sie bröcklig sind, leicht ein Zerreissen und somit Unbrauchbarwerden des Schnittes. Will man nicht sehr dünne Schnitte haben, die für Epithelstudien z. B. unerläfslich sind, so kann man auch in Photoxylin bez. Celloidin einbetten.

Zur Erkenntnis der *Fettbildung* mufs man in einem Osmiumsäurehaltigen Gemische fixieren und womöglich mit Holzessig nachbehandeln. Nur osmiertes Fett löst sich nicht in Chloroform — Xylol bez. Terpentin ist gar nicht zu gebrauchen —, während nicht osmiertes Fett auf dem Schnitte nicht erkennbar ist. Am besten freilich ist für den vorliegenden Zweck, von jeder Einbettung Abstand zu nehmen und feucht nach blofser Umrandung zu schneiden.

Sehr wichtig ist beim Studium der Haut die angewandte *Färbungsmethode*, die sich nach der Fixierung richten mufs.

Hat man in Flemming'scher *Lösung* fixiert, so färbt man nach der

Vorschrift von Lustgarten mit Victoriablau. Man nimmt von einer konzentrierten alkoholischen Victoriablaulösung 1—2 Teile, fügt 4 Teile Wasser hinzu und färbt die Schnitte 24 Stunden. Darauf werden dieselben 5—10Sekunden in absolutem Alkohol abgespült und entwässert, mit Bergamottöl aufgehellt, dieses durch Xylol verdrängt und schliefslich in Kanadabalsam aufgehoben. *Man darf nicht zu viel entwässern* und kann auch mit Vorsicht verdünnte Essigsäure zum Entfärben benutzen. Bewahrt man die Präparate unter Lichtabschlufs auf, so sind sie mindestens $^1/_2$ Jahr haltbar. *Resultat:* Bindegewebe, Zellleiber schwach grünlich, Kerne dunkler grün, elastische Fasern blaugrün und scharf hervortretend.

Ebenfalls gute Resultate liefert die Doppelfärbung mittels Safranin-Gentiana nach Flemming (VII 47). Die verhornten Teile der inneren Wurzelscheide der Haare und die elastischen Fasern sind intensiv gefärbt.

Hat man in *absolutem Alkohol* fixiert, dann sind folgende drei Methoden empfehlenswert:

Nach Unna färbt man die Schnitte mit altem basischen Methylenblau (Methylenviolett- und Methylenrot- haltig), entfärbt nach Abspülen in Wasser in einer Glycerinäthermischung, welche durch die Schuchardt'sche Fabrik käuflich zu haben ist, während $^1/_4$ Minute, wäscht sorgfältig aus, entwässert und montiert in gewöhnlicher Weise. Zur *Färbung des Collagens* färbt man 4—6 Stunden in alkalischer Methylenblaulösung, bringt dann für eine Nacht in eine 0,1 % spirituöse, neutrale Orceinlösung, spült in Alkohol ab, hellt in Bergamottöl auf und montiert in Kanada. *Resultat:* Plasmazellen blau, Markzellen kirschrot, Collagen orceinrot.

Eine spezialisiertere Vorschrift von Unna für die Orceinfärbung der Haut nach Alkoholbehandlung ist die folgende: Man stellt sich zwei Lösungen her. Lösung I: Orcein (Grübler) 0,1 gr., Alkohol 95 % 20 ccm., Aqua destillata 5 ccm. Die Lösung hebt man in einem Tropfglase auf. Lösung II: Konzentrierte Salzsäure 0,1 ccm., Alkohol 95 % 20 ccm., Aqua destillata 5 ccm. Man giebt die Lösung I in verschiedene Uhrschälchen und fügt von II tropfenweise zu, entweder halb so viel bis $1^1/_2$ mal so viel. In jedem Uhrschälchen, die gut zugedeckt werden müssen, färbt man Hautschnitte. Die elastischen Fasern müssen gesättigt dunkelbraun werden; die Mischung, in welcher dies Resultat erreicht wird, die wählt man zur weiteren Benutzung aus.

Um die *Faserung der Epithelzellen der Haut* darstellen zu können, benutzt man nach Alkoholfixierung die Weigert'sche *Fibrinfärbung;* die Schnitte müssen *excessiv dünn* sein. Man hält sich eine konzentrierte wässrige Lösung von Methylviolett 6 B und konzentriertes Anilinwasser (VII C) vorrätig. Jedesmal zum Gebrauche mischt man von beiden Stammflüssigkeiten gleiche Teile und färbt die Schnitte auf dem Objektträger 5 Minuten lang. Dann spült man in Wasser ab und behandelt mit Jodjodkaliumlösung (Jod 1,0, Jodkalium 3,0, Aqua destillata 300). Je nach der Dicke der Schnitte mufs dieselbe bis eine Minute einwirken, die Schnitte werden dann in Wasser abgespült, kurz, auf Sekunden, in Alkohol gebracht und in Xylolanilin (Xylol 2 Teile, Anilinöl 1 Teil) ausgezogen, bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. Dann reines Xylol, Kanadabalsam.

Müller-Präparate färbt man in Pikrokarmin (VII 35, 36) oder Pikrokarmin-Hämatoxylin (VII 50); Pikrinsalpetersäure-Präparate

werden in Indigkarmin-Boraxkarmin oder Orange G-Hämatein (VII 34, 44) gefärbt.

Zum Studium *der Leisten der Haut* hat Blaschko einer originellen Methode sich bedient.

An der Haut sogenannter faultodter Früchte (des *Menschen*) lösen sich intrauterin Epidermis und Cutis von einander, ohne dafs die Gewebselemente zerstört werden. Man reinigt die Oberhaut der Frucht und zieht dann die Haut in grofsen Lappen von der Unterlage ab. Der abgezogene Lappen wird mit der Schleimschicht nach oben auf einem Objektträger ausgebreitet und in halb trocknem Zustande mit Böhmer'schen Hämatoxylin (VII 12) übergossen. Nach 3—5 Minuten wird das Objekt abgespült und entweder in Glycerin untersucht oder nach Entwässerung in Alkohol und Aufhellung in Nelkenöl in Kanadabalsam eingeschlossen oder endlich auf dem Objektträger angetrocknet. In letzterem Falle ist das Objekt in 1—2 Tagen genügend trocken und kann als papierdünne Schicht vom Objektträger abgehoben werden. Man bringt das Präparat auf einen neuen Objektträger und begiefst mit einer reichlichen Menge Kanadabalsam, der nach wenigen Tagen lufttrocken ist. Solche Präparate, die man lange aufbewahren kann, liefern bezüglich der Demonstration der Hautleisten die instruktivsten Bilder.

Bei *Tieren* (*Säugern*) kann man rasch und schonend nach Blaschko die Oberhaut von der Lederhaut entfernen, um *Flächenbilder der Leisten* zu gewinnen, wenn man Hautstücke in 6 % oder, falls dieselben zart sind, in 1 % Holzessig einlegt; auch $^1/_3$ % Essigsäure ist nach Philippson für diesen Zweck brauchbar. Die Dauer der Einwirkung mufs jedes Mal von neuem festgestellt werden. Wenn das Abziehen leicht und vollständig gelingt, dann ist die Mazeration zu unterbrechen und, wie vorher geschildert wurde, weiter zu verfahren.

Die *Nerven der Haut* kann man durch Vergoldung darstellen (VIII 2, 5, 6, 7), doch thut man gut, durch leichte Mazeration in Essigsäure die Hornschicht zu entfernen; nach der Reduktion wird gehärtet. Ferner ist für diesen Zweck empfohlen die Ehrlich'sche vitale Methylenblaumethode (VII γ) und die Golgi'sche schnelle Methode (VIII 11—14). Smirnow rät an, die Haut in die Altmann'sche Lösung (III 23) 3-5—10 Tage einzulegen, dann in einer Lösung von Argentum nitricum (0,1 %) abzuspülen und in Argentum nitricum-Lösung von 1 % auf 18—30—40 Stunden zu übertragen. Dann wird in 90 % Alkohol ausgewaschen, 2—3 Stunden in absoluten Alkohol gebracht und geschnitten. Die Schnitte kommen nach dem Entwässern in Xylol oder Terpentin, werden mit Fliefspapier abgetrocknet und in Dammarlack eingeschlossen.

Bonnet fixiert Haut in $^1/_3$ % Chromsäure, überfärbt die Schnitte mit Hämatoxylin (erzeugt also einen Chromlack) und differenziert in alkoholischer Lösung von rotem Blutlaugensalz.

Zur Untersuchung der *Absonderungsgebilde der Haut* — Haare, Nägel, Federn etc. — behandelt man diese Gebilde längere Zeit mit starken Säuren (Essig-, Salz-, Schwefelsäure) oder kocht sie in Alkalien (Natron-, Kalilauge). Um *Querschnitte von Haaren* zu erhalten, hat Henle folgendes Verfahren empfohlen. Man rasiert sich scharf aus (wenn man es kann) und rasiert sofort nach. In dem Seifenschaum, der beim zweiten Rasieren auf dem Messer bleibt, sucht man mit der Lupe die Haarquerschnitte heraus.

β) Das Geschmacksorgan.

Zur *Isolation* der zelligen Elemente der Geschmacksorgane (Papillae vallatae und Papillae foliatae) sowie der Papillae fungiformes und filiformes dürften konzentrierte wässrige Oxalsäurelösung oder Haller'sches Gemisch (II 20, 21) am geeignetsten sein. Will man Schnitte anfertigen, so fixiert man in Chromsäure, Flemming'scher Lösung, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure oder Pikrinosmiumsalpetersäure (III 3, 21, 35, 36, 37) und färbt die von paraffiniertem Materiale gemachten Schnitte beliebig. Bei Verwendung von Osmiumsäure haltigen Fixierungsflüssigkeiten ist die Nachbehandlung mit Holzessig (III 26) sehr zu empfehlen. Zu vermeiden sind alle Gemische, bei denen starke Salpetersäure zur Verwendung gelangt, weil diese das Epithel loslöst. Bei der Fixierung und Paraffinierung von Teilen der Zunge sind genau dieselben Kautelen zu beobachten wie bei der Haut, denn auch hier durchtränken sich die Gewebselemente sehr schwer, sei es mit dem fixierenden Reagens, sei es mit dem Paraffin, während die Verkrümmung bei der Fixation in viel geringerem Grade statt hat. Es ist ferner anzuraten, die Schleimhaut der Zunge möglichst flach abzutragen, damit nicht zu viel Muskelsubstanz in dem zu fixierenden Stücke vorhanden ist.

Für die Untersuchung der Nervenendigungen ist in neuester Zeit vielfach die Golgi'sche Methode (VIII 11—14) und die Ehrlich'sche Methylenblaufärbung verwandt worden. Bei der letzteren wird folgendes Verfahren empfohlen. Das chloroformierte oder eben getödtete Tier (z. B. *Kaninchen*) wird mit 4 % Methylenblau injiziert. Die intensiv blau gewordene Zunge blafst nach 15—20 Minuten ab. Jetzt wird die Papilla foliata in Hollundermark eingeklemmt und in möglichst dünne der Längsrichtung der Blätter parallel orientierte Schnitte zerlegt. Diese werden in pikrinsaurem Ammoniak oder Hoyer'schem Pikrokarmin (VII 37) fixiert und in Glycerin eingeschlossen.

γ) Das Geruchsorgan.

Um die Zellen der *Regia respiratoria* zu isolieren, genügt eine Mazeration in $^1/_3$ Alkohol (II 1); die Zellen der *Regio olfactoria*, besonders die *Sinneszellen*, werden aber in diesem Reagens sehr stark verändert, hier sind vielmehr mit Erfolg verwendbar dünne Chromsäure, 0,1 % Osmiumsäure, Jodserum (II 4, 7, 13, 19) oder Pacini'sche Flüssigkeit. Für die letztere, deren Originalempfehlung ich nicht finden konnte, giebt Behrens in seinen Tabellen folgende beiden Vorschriften: I. Sublimat 1 gr., Chlornatrium 2 gr., 80 % Glycerin 13 gr., Wasser 113 ccm. II. Sublimat 1 gr., Glycerin 80 % 43 gr., Eisessig 2 ccm., Wasser 115 ccm. Mir scheinen — ich besitze über das Reagens keine eigenen Erfahrungen — beide Gemische wohl verwertbar, wenn man nur die Vorsicht gebraucht, ganz frische noch lebenswarme Teile einzulegen, und wenn man die allgemein bei Mazerationen zu beobachtenden Regeln genau befolgt.

Will man an *Schnitten* die Epithelien der Regio olfactoria studieren, so fixiert man am besten in Flemming'scher Lösung (III 21) und läfst entweder eine Nachbehandlung mit Holzessig folgen (III 26) oder färbt mit einem kernfärbenden Anilinfarbstoff. Behält man, was sehr anzuraten ist, schon um der Orientierung willen, das Septum narium im

Präparat und will man so beide Seiten gleichzeitig schneiden, so mufs man vorher entkalken (IV 1, 2, 3). Will man die Drüsen untersuchen, so fixiert man bei beiden Regionen in Pikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 35, 39) und färbt die Schnitte mit Eosin-Hämatoxylin, Orange G-Hämatein oder dem Ehrlich-Biondi'schen Dreifarbengemisch (VII 43, 44, 51).

Auch bei diesem Organe sind zur Untersuchung der Nervenendigungen die Golgi'sche Methode (VIII 11—14) und die Ehrlich'sche Methylenblaufärbung empfohlen worden (VII γ).

δ) Das Gehörorgan.

a) **Inneres Ohr.** Die Isolation der zelligen Gebilde des *Vorhofs*, des Vereinigungspunktes der *Bogengänge* und der *Schnecke*, erfolgt nach Mazeration in verdünnter Müller'scher Flüssigkeit (1 : 3 Wasser) oder in $^1/_4$ % Osmiumsäure. Die Zellen der *Schnecke* und der *Bogengänge* isoliert man nach Behandlung mit der Retzius'schen Osmiumgoldmethode (VIII 8). Die Schnecke wird vor dem Einbringen in die zuerst verwendete Osmiumsäure vorsichtig eröffnet. Der Knochen darf hierbei nicht decalciniert werden, sondern wird mit dem Skalpell abgetragen und die Präparate werden mit einer feinen Schere hergestellt.

Zur Fixierung ist die Chromosmiumsäure von Flesch und die Flemming'sche Lösung zu empfehlen (III 19, 21). Doch wird man nicht unbedingt auf gute Resultate zählen dürfen; die Fixierung der Elemente des inneren Ohres gehört zu den schwierigsten Aufgaben der histiologischen Technik, weil, selbst wenn man das ovale Fenster eröffnet, die Flüssigkeiten nur schwer eindringen und weil die Entkalkung des Felsenbeins wieder viel zerstören kann.

Nach L. Katz verfährt man am besten folgendermaafsen: Man wählt jüngere Tiere (*Katze* oder *Kaninchen*), präpariert das Felsenbein heraus und eröffnet die Schnecke an der *basalen* Schneckenwindung eventuell aufserdem noch an dem oberen halbzirkelförmigen Kanal. Dann legt man für circa 10 Stunden in $^1/_2$ % Osmiumsäurelösung ein. Darauf werden *zu dieser Lösung* circa 100 ccm. Chromessigsäure gesetzt, die man in folgendem Verhältnisse gemischt hat: Chromsäure 0,3 gr., Eisessig 0,5 ccm., Aqua destillata 100 ccm. In *dieser* Chromosmiumessigsäure bleiben die Präparate circa 4 Tage und werden dann ebenfalls für circa 4 Tage in frische Chromessigsäure von derselben Zusammensetzung eingebracht. Dann wird $^1/_2$ Stunde ausgewaschen und entkalkt. Zur Entkalkung ist die von Katz angegebene Chromsalpetersäure oder das Chromsalzsäurepalladiumchlorür zu verwenden (IV 4, 5).

Will man die Schnecke intakt erhalten, was bei *pathologischem Material* (vom *Menschen*) unbedingt notwendig ist, so mufs man die Osmiumsäure in die geöffneten halbzirkelförmigen Kanäle *injizieren*. Dann wird in Osmiumsäure eingebracht und wie vorher behandelt.

Nach dem Entkalken wird ausgewaschen, langsam erhärtet und in Celloidin eingebettet.

Man kann nach Katz auf diesem Wege auch *transparente Präparate* herstellen, also *Übersichtsbilder* erzielen, wenn man nach dem Entkalken und Erhärten in Xylol aufhellt und das *ganze Felsenbein* einschliefst. Solche *transparenten Präparate* sind höchst instruktiv.

Ferreri fixiert 15 Minuten lang das *Labyrinth* in folgender (Mix-

GAZZINI'scher) Mischung: 2 Teile Sublimat, 1 Teil Alkohol absolutus 1 Teil Essigsäure. Diese Fixierung kann unmöglich gute Resultate liefern, ebenso wenig wie die in MÜLLER'scher Flüssigkeit (III 8); denn bei der ersteren sind nach 15 Minuten die Reagentien noch gar nicht bis zu den Zellen gelangt und bei Verwendung der MÜLLER'schen Flüssigkeit ist alles gefault, ehe von einer Fixierung die Rede sein kann. Zur Entkalkung verwendet FERRERI Phloroglucinsalzsäure (IV 6). Die GOLGI'sche Methode dürfte beim Gehörorgan ebenfalls anzuwenden sein, weniger die Methylenblaufärbung.

b) **Mittleres Ohr.** Die *Tuba Eustachii* fixiert man in absolutem Alkohol (III 1) und schneidet feucht oder nach Einbettung. Färbung beliebig.

Die *Gehörknöchelchen* werden wie gewöhnlicher Knochen behandelt.

Das *Trommelfell* wird am besten in Zusammenhang mit seinem Knochenringe herauspräpiert und dann für 3—4 Tage in FLEMMING'sche Lösung gebracht (III 21), später in 2%—3% Salzsäure entkalkt und nach Photoxylin- bez. Celloidineinbettung geschnitten. Der mit dem Trommelfell verbundene Hammer wird nicht entfernt, sondern mitgeschnitten. Die Schichtung des Trommelfells studiert man an Quer- und Längsschnitten. *Flächenpräparate* desselben stellt man sich in der Weise her, dafs man das frische Trommelfell in gewöhnlichem Wasser mazeriert. Die Cutisschicht löst sich dabei leicht ab und man kann unter Wasser bei Anwendung einer Präparierlupe mittels der Nadel die Radiär- und Circulärfaserschicht zur Anschauung bringen.

Die *Nerven* des Trommelfells untersucht man nach Vergoldung (VIII 1, 4, 5) oder nach der Methylenblaufärbung EHRLICHS (VII γ).

c) **Äufseres Ohr.** Die Auricula wird wie Haut bez. Netzknorpel behandelt.

α) Das Gesichtsorgan.

a) **Der Augapfel.** *Übersichtsbilder vom Auge der Vertrebaten* erhält man, wenn man den Bulbus, in den man vorsichtig an einer Stelle des Aquators eine Öffnung gemacht hat, in MÜLLER'scher Flüssigkeit (III 8) erhärtet. Dazu sind Wochen und Monate erforderlich. Ist ein genügender Härtegrad erreicht, so halbiert man das Auge, indem man es von der Cornea bis zur hinteren Peripherie durch einen Schnitt spaltet. Der Kern der Linse wird hier Schwierigkeiten machen, da er sehr hart ist und sich nicht schneiden läfst; man darf daher die Eröffnung nicht genau im Scheitel der Cornea vornehmen, sondern seitlich desselben. Dann wird in Alkohol gehärtet, mit Pikrokarmin (VII 35, 36) durchgefärbt und nach nochmaliger Härtung in Photoxylin bez. Celloidin eingebettet. Vor dem Schneiden mufs man vorsichtig aber sorgfältig den Kern der Linse mit einem Messer herauszubrechen versuchen, weil dessen Anwesenheit die Anfertigung der Schnitte hindert und das Mikrotommesser ruiniert.

Das *Auge der Cephalopoden* kann zur Gewinnung von Übersichtsbildern in der gleichen Weise wie das der Vertebraten behandelt werden.

Das Auge der übrigen *Mollusken*, der *Crustaceen* und *Würmer* mufs in Pikrinsalpetersäure oder Sublimat (III 35, 39) gut fixiert werden.

Bei Besprechung der einzelnen Teile des Auges halte ich mich an das Organ der Vertrebraten.

1) **Die Sclera** studiert man am besten auf Schnitten, welche beliebig fixiert und gefärbt waren. Dieselbe durchtränkt sich überaus schwer mit Paraffin, daher mufs man gut entwässern und lange mit Chloroform behandeln.

2) **Die Cornea.** Man bringt nach LEBER die Hornhaut eines *Frosches* frisch in eine 0,5—1 % Lösung eines Eisenoxydulsalzes (z. B. MOHR'sches Salz) auf einige Zeit. Dann nimmt man sie heraus, entfernt durch Pinseln das Epithel der Vorderfläche und bringt sie zum zweiten Male in die Lösung des Eisenoxydulsalzes, so dafs sie in letzterem *im ganzen*, also beide Male zusammen, 5 Minuten verweilt hat. Man spült darauf in Wasser ab und schwenkt sie in einer 1 % Lösung von Ferridcyankalium, bis eine intensiv blaue, gleichmässige Färbung eingetreten ist, was einige Minuten dauert. Nach Abspülen in Wasser zeigt sich die Grundmasse gefärbt, während die Hornhautkörperchen und -kanäle hell geblieben sind.

Ferner kann man, um wie bei der vorigen Methode die einzelnen Elemente der Hornhaut in differenter Färbung darzustellen, dieselbe *versilbern* oder *vergolden*. Zur *Versilberung* legt man die frische Cornea in eine 1 % Lösung von Argentum nitricum oder wendet die DECKHUYZEN'sche Methode an (VIII 9, 10). Nach der Reduktion wird in Alkohol gehärtet und geschnitten. Die Bilder sind negativ, d. h. Hornhautkörperchen und -kanäle sind hell auf dunklem Grunde. Positive Bilder, also dunkle Körperchen und Kanäle auf hellem Grunde, erhält man nach STÖHR, wenn man vor der Reduktion in eine 3 % Kochsalzlösung auf 5 Minuten überträgt und die Hornhaut dann in destilliertem Wasser dem Sonnenlichte aussetzt. Nachhärten in Alkohol.

Zur *Vergoldung* ist die COHNHEIM'sche oder die RANVIER'sche Methode mit Vorteil verwendbar (VIII 1, 4). Nach der Reduktion Auswaschen, Härten und Schneiden.

Will man blofs die *Substantia propria corneae* untersuchen, so pinselt man bei dünnen Hornhäuten das Epithel der Vorderfläche ab, breitet das Organ nach eingetretener Reduktion der Metallsalze flach auf dem Objektträger aus und schliefst in Glycerin ein. Bei dicken Hornhäuten macht man *Flachschnitte*. Will man aber das Epithel und die DESCEMET'sche Haut mit im Schnitte haben, so mufs die Schnittrichtung parallel mit der Hornhautwölbung gewählt werden.

3) **Die Chorioidea.** Zupfpräparate von frischem Materiale zeigen die einzelnen Teile der Gefäfshaut. Die Gefäfsverteilung in derselben wird am besten nach der ALTMANN'schen Korrosionsmethode (X 5) studiert.

4) **Die Iris.** Schnitte durch die Iris werden angefertigt nach Fixierung und Härtung derselben mit dem vorderen Teile des Bulbus inklusive der Linse.

5) **Die Linse.** Die Struktur der Linse wird am besten an frischen oder mit Isolationsflüssigkeiten behandelten Objekten studiert. Schnitte lassen sich durch die Linse erwachsener Tiere und älterer Foeten nicht anfertigen, da das Zentrum derselben sich nicht durchtränkt. Zur Isolation ist $^1/_3$ Alkohol und 0,1 % Osmiumsäure zu empfehlen (II 1, 13). Um die *Linsenkapsel* von der Fläche betrachten zu können, zieht man dieselbe mit der Pinzette von der etwa 1 Stunde in $^1/_3$ Alkohol verweilenden Linse vorsichtig ab und färbt beliebig nach. Man

kann in Glycerin aufheben oder in üblicher Weise in Kanada bez. Dammar montieren.

6) **Der Glaskörper** wird wie das Schleimgewebe behandelt (cfr. Kap. II 8 dieses Abschnittes).

7) **Die Retina.** Die einzelnen Retinaelemente, namentlich *Stäbchen und Zapfen*, erkennt man am besten an Zupfpräparaten, zu deren Herstellung, die heutzutage allerdings nicht Jedermanns Sache ist, nach den klassischen Untersuchungen von Max Schultze die Mazeration in Jodserum obenan steht (II 19). Aufserdem kann man dünne Chromsäure, 0,1 % Osmiumsäure und dünne Pikrinsäure (II 7, 13, 17) verwenden.

Zur Fixierung ist für *Vertebraten*-Retina vorzüglich die $3^1/_2$ % Salpetersäure nach Engelmann und die Kombination von Salpetersäure und Müller'scher Lösung nach Angelucci (III 13 und 14). Bei *Wirbellosen* kann Salpetersäure nicht angewendet werden, da sie das Pigment auflöst. Hier sind Flemming'sche Lösung, Pikrinsalpetersäure und Sublimat angebracht (III 21, 35, 39), welche Reagentien übrigens auch bei Vertebraten vorteilhaft verwendet werden können.

Um die Retina der Vertrebraten gut zu fixieren, schneidet man mit einer scharfen Schere den Bulbus im Äquator durch und bringt die hintere Hälfte in viel Flüssigkeit; die Retina herauszupräparieren und allein zu fixieren ist nicht sehr ratsam, weil bei dieser Manipulation Verletzungen ausgedehnten Grades oft nicht zu vermeiden sind. Man bettet daher auch zur Schonung der Netzhaut dieselbe mit Chorioidea und Sclera in Paraffin ein.

Bei Evertebraten sind die lichtempfindlichen Teile der Netzhaut von einem dichten Pigmentmantel umhüllt, den man entfernen mufs, ehe man an das Studium der betreffenden Organteile denken kann. Zur Entfärbung dient das Grenacher'sche Gemisch oder alkoholische Natronlauge nach *meiner* Angabe oder die P. Mayer'sche Methode (IV 7, 8, 9).

In neuester Zeit sind für das Studium der Nervenverteilung in der Retina in ausgedehntem Mafse die Ehrlich'sche Methylenblaufärbung (VII γ) sowie die Golgi'sche Methode (VIII 11—14) verwendet worden. Ramòn y Cajal empfiehlt für die *Retina der Vögel* folgende Chromsilberimprägnierung: Die frische Retina wird 2 oder 3 Tage in einem Gemisch von 4 Teilen 3 % Kali bichromicum-Lösung und 1 Teil 1 % Osmiumsäurelösung fixiert. Und zwar nimmt man für jede Retina etwa 15—20 ccm. Flüssigkeit. Dann wird sofort in 0,75 % Argentum nitricum-Lösung übertragen. Die Schnitte, welche ziemlich dick sein müssen, werden wiederholt in 40 % Alkohol gewaschen und in Nelkenöl aufgehellt.

8) **Die Blutgefäfse und Lymphgefäfse** des Bulbus bringt man durch Injektion bez. durch Einstichinjektion, letztere in den Opticus, zur Anschauung.

b) **Die Schutzorgane des Auges.** Die *Thränendrüsen* werden wie Speicheldrüsen behandelt, die *Augenlider* wie die Haut. Zur Erkennung der *Nervenendigungen* in der *Conjunctiva palpebrae* sind entweder die Ehrlich'sche Methylenblaufärbung (VII γ) oder die in diesem Abschnitte Kap. XI für die sensiblen Nervenendigungen empfohlenen Methoden zu verwenden.

Register.

Es sind in diesem Register nur die Methoden in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt, während ein Hinweis auf die Organe und deren Teile sich nicht findet. Wer hinsichtlich der letzteren etwas nachschlagen will, sei auf das Inhaltsverzeichnis verwiesen. Die Zahlen hinter den Artikeln bedeuten die Seite.

A.

Abbe'scher Zeichenapparat 93.
Adjektive Färbung 56, 72.
Aether (zur Axenzylinderdarstellung) 134.
Alauncochenille 61.
Alkohol (verdünnt) 5.
Alkohol absolutus 14.
Alkohol-Eisessig 14.
Altmann'sche Lösung 20.
Ammonium bichromicum 6.
Anilinblau 135.
Aniline (zwei) 70.
Anilinfarbstoffe 63.
Anilinlacke 75.
Anilinöl 65.
Anilinwasser 65.
Apáthy'sches Gemisch 8.
Arnold'sche Methode 6.
Asphaltlack 86.
Aufheben (feucht) 85.
Aufheben (trocken) 87.
Aufhellen 88.
Aufkleben 49.
Aufkleben mit destilliertem Wasser 51.
Automatisches Mikrotom 48.

B.

Bandwurmmethode 44.
Beizen 56.
Bergamottöl 88.
Berkley'sche Methode 131.
Berliner Blau 91.
Bismarckbraun 66.
Bleu de Lyon 68.
Blochmann'sche Methode zur Entfernung der Eihaut 125.
Bonnet'sche Methode 139.
Brasilin 98.
Buchholz'sche Methode 6.

C.

Celloidineinbettung 37.
Chlordämpfe 29.
Chloroform 33.
Chloroform (zur Axenzylinderdarstellung) 134.
Chlorpalladiumsalzsäure 28.
Chlorsaures Kali mit Salpetersäure 8.
Chromsäure 6, 15.
Chromameisensäure 15.
Chromessigsäure 15.
Chromessigsäure (nach Katz) 141.
Chromosmiumsäure 19.
Chromosmiumsäureeisessig 19.
Chromosmiumsalpetersäure 20.
Chrompikrinsäure 23.
Chrompikrinsalpetersäure 24.
Chromquecksilbermethode 85.
Chromsalpetersäure 15.
Chromsalpetersäure (zum Entkalken) 28.
Chromsalzsäurepalladiumchlorür 28.
Cohnheim'sche Vergoldung 81.
Cox'sche Lösung 17.
Cylindermikrotom 46.

D.

Dahlia 66.
Dammarlack 89.
Deckglastrockenpräparate (Blut) 108.
Deckglastrockenpräparate (Samen) 124.
Definierebene 94.
Dialysator 32.
Differenzieren 57.
Differenziertannin 76.
Doppelfärbung 55.
Doppelmesser 44.
Dreifachfärbung 55, 71.
Dreifarbengemisch (Oppel) 71.
Drost'sches Gemisch 7.
Durchfärbung 57.

E.

Eau de Javelle 125.
Ebner's Entkalkungsflüssigkeit 28.
Ehrlich-Biondi'sches Farbengemisch 71.
Einbetten 31.
Einklemmen 30.
Einstichverfahren 90.
Eisenalaun 73.
Eisenhämatoxylin 73.
Eiweisslösung 50.
Embryograph 94.
Entfärben 28.
Entkalken 27.
Entwässern 32.
Eosin 66.
Eosin-Hämatoxylin (Hämatein) 69.
Eosin-Hämatoxylin (zur Blutfärbung) 109.
Eosin-Methylblau 70.
Eosin-Methylgrün 70.
Erhärten 13.
Erlicki'sche Flüssigkeit 17.

F.

Farbenkombinationen 66.
Farbflotte 55.
Farblack 56.
Farbstoffe 59.
Färbung 54.
Fibrinfärbung 138.
Fixieren 11.
Fixierung des Blutes 109.
Fixierung von Golgi-Präparaten 128.
Flemming'sche Goldmethode 82.
Flemming'sche Lösung 19.
Foà'sche Lösung 17.
Formalin 27.
Formol 27.
Freihandschneiden 46.
Fuchsin 64.
Fuchsin (verdünnte Lösung) 134.

G.

Gefriermikrotom 48.
Gentianaviolett 66.
Glaswinkel 35.
Glycerin 85.
Glycerinäthermischung 138.
Goldchlorid 80.
Goldchloridkalium 81.
Goldchloridnatrium 81.
Golgi'sche Goldmethode 82.
Golgi'sche Methode der Versilberung und deren Modifikationen 83, 129.
Gram'sches Verfahren 64.
Grenacher's Entfärbungsflüssigkeit 29.
Gudden'sche Masse 31.

H.

Hämatein 63.
Hämatoxylin 61.
Hämatoxylin-Anilin 68.
Hämatoxylinlacke 73.
Hämatoxylin-Safranin 68.
Hämatoxylin-Säurefuchsin 102.
Häminkrystalle 110.
Hämoglobinkrystalle 110.
Haller'sches Gemisch 8.
Hénocque'sche Goldmethode 81.
Hermann'sche Flüssigkeit 26.
Hollundermark 30.
Holmgren'scher Apparat 3.
Holzessig (roh) 21.
Holzessig (gereinigt) 117.
Holzessig (zur Untersuchung der Haut) 139.
Hopkins'sche Salpetersäure-Alaun-methode 8.
Humor aqueus 4, 97.

I. J.

Indigkarmin 67.
Injektion 90.
Inversion der Färbung 76.
Jodserum 8.

K.

Kali aceticum 86.
Kali bichromicum 6, 7.
Kali bichromicum mit Osmiumsäure 20.
Kali chromicum flavum 119.
Kalilauge (alkoholisch) 65.
Kanadabalsam 89.
Karmin (einzelne Methoden) 59.
Karmin (neutrales) 119.
Karmine (zwei) 67.
Karmin-Aniline 67.
Karmin-Hämatoxylin 66.
Karminmasse 91.
Karminsäure 61.
Kernfärbemittel 54.
Kleinenberg'sche Flüssigkeit 22.
Klemmleber 30.
Knochenöl 42.
Kochsalzlösung (physiologische) 4.
Kochsalzlösung (10%) 118.
Kollodium 45.
Kollodium (zur Axenzylinderdarstellung) 134.
Koliodiummethode (Weigert) 52.
Kollodiumnelkenöl 50.
Konstanter Druck (bei Injektion) 90, 91.
Kontrastfärbung 55.
Korrosionsmethode 92.
Kreosot 50.
Kreosotterpentinöl 88.
Krönig'sche Masse 86.
Kultschitzky'sche Hämatoxylinfärbung 131.
Kupferhämatoxylin 73.

L.

Landois-Gierke's Flüssigkeit 6.
Lang'sche Flüssigkeit 25.
Leber'sche Methode (für die Cornea) 143.
Liquor natri hypochlorosi 125.
Löwitt'sche Goldmethode 82.

Lügol'sche Lösung 64, 101.
Lunge des lebenden Frosches 3.
Lysol 27.

M.

Magdalarot 126.
Mann'sche Lösung 26.
Marchi'sche Methode 20.
Marinescu'sche Goldmethode 82.
Maskenlack 86.
Mastixkollodium 45.
Merkel'sche Flüssigkeit 26.
Mesenterium des lebenden Frosches 3.
Messerstellung 43.
Metallimprägnation 80.
Metallwinkel 35.
Methylblau II 126.
Methylenblau (vital) 77.
Methylenblau (basisch) 138.
Methylenblau (alkalisch) 138.
Mikron 36.
Mikrotome 46.
Mingazzini'sche Mischung 142.
Mississippistein 42.
Mohr'sches Salz 143.
Molybdänsaures Ammoniak 27.
Montieren 85.
Monti'sche Methode 132.
Müller'sche Flüssigkeit 16.

N.

Natronlauge (alkoholisch) 29.
Nelkenöl 50. 88.

O.

Oberhäuser'sche Camera 94.
Obregia'sche Methode zur Fixierung von Golgi-Präparaten 128.
Ölstein 42.
Orange G 66.
Orange G-Hämatein 69.
Orangeverfahren 72.
Orcein 138.
Orientiervorrichtung 47.
Osmiumsäure 7. 18.
Osmiumsäure (in Dampfform) 19.
Osmiumessigsäure 19.
Osmiumsäure und Essigsäure 7.
Osmiumgoldmethode 83.
Oxalsäure 8.

P.

Pacini'sche Flüssigkeit 140.
Palladiumchlorür 26.
Pal'sche Hämatoxylinfärbung 75.
Pal'sche Hämatoxylinfärbung mit Safranin 75.
Papierkästchen 35.
Paraffin 34.
Paraffineinschmelzung 32.
Paraffinrähmchen 35.
Parenchymflüssigkeit 97.
Perényi'sche Flüssigkeit 15.
Phloroglucinsalzsäure 28.
Photoxylin 40.
Photoxylinlappenmethode 52.
Physiologische Kochsalzlösung 97.
Pikrokarmin 67.
Pikrokarmin-Hämatoxylin 71.
Pikrinsaures Ammoniak 68, 77.
Pikrinsäure 21.
Pikrinsäure (verdünnt) 7.
Pikrinsäure (alkohol) 7.
Pikrineisessig 22.
Pikrinessigsäure 22.
Pikrinessigosmiumsäure 24.
Pikrinosmiumschwefelsäure 24.
Pikrinsalpetersäure 23.
Pikrinschwefelsäure 22.
Pinselmethode 9.
Plasmafarbstoffe 55.
Platinchloridlösung 26.
Plattenmodelliermethode 95.
Polarisiertes Licht 107.
Prichard'sche Mischung 81.
Pyrogallussäure 21.

R.

Ranvier'sche Goldmethode 82.
Rekonstruktion 94.
Rohrzucker und schweflige Säure 9.

S.

Säurefuchsin 65.
Safranin 64.
Safranin (nach Babes) 65.
Safranin-Gentiana 70.
Safranin-Lichtgrün 70.
Salpetersäure ($3^1/_2\%$) 17.
Salpetersäure (20%) 8.
Salpetersäure (zum Entkalken) 28.
Salpetersäure-Kali bichromicum 18.
Salpetersäure-Müller'sche Lösung 17.
Salpetersaures Silber 83.
Salzsäure 9.
Schällibaum'sche Methode 50.
Schaffer'sche Färbungsmethode 132.
Schellackmethode 49.
Schienenmikrotom 48.
Schleifen des Messers 41.
Schneiden 41.
Schnittfärbung 57.
Schnittstrecker 44.
Schrauben-Schienenmikrotom 47.
Schraubenmikrotom 46.
Schüttelmethode 9.
Schweflige Säure (nach Sandmann) 9.
Schwimmhaut des lebenden Frosches 3.
Sehrwald'sche Methode (für Golgi-Präparate) 128.
Senkmethode 33.
Silber (salpetersaures) 80.
Smaragdgrün 76.
Smirnow'sche Methode 139.
Speckleber 30.
Stabilit 39.
Streichriemen 42.
Ströbe'sche Axenzylinderfärbung 135.

Stückfärbung 57.
Sublimat 24.
Sublimat-Chromsäure 25.
Sublimateisessig 25.
Sublimatessigsäure 25.
Sublimat-Kupfersulfat 26.
Sublimat-Pikrinsäure 25.
Sublimatsalpetersäure 25.
Substantive Färbung 55, 59.

T.

Tannin 21.
Tannin-Brechweinstein 76.
Terpentinöl 33, 88.
Transparentes Gelb 91.
Triacidgemisch 71.
Trypsin 10.

U.

Überlebende Organe 3.
Umranden 31.
Umranden (mit Wachs) 86.

V.

Venetianisches Terpentin 87.
Verdauungsmethode (nach Kühne) 10.
Versilberung (nach Böhm und Oppel) 119.
Victoriablau 138.
Vitale Methylenblaumethode 77.

W.

Wachsplatte (Born) 95.
Wärmeschrank 34.
Walrat 31.
Wasserbad 34.
Weigert'sche Aufhellung 89.
Weigert'sche Hämatoxylinfärbung 74.
Wolters'sche Methode 101.

X.

Xylol 33.
Xylolanilin 138.

Z.

Zählapparat (für Blutkörperchen) 108.
Zeichnen 92.
Zenker'sche Lösung 17.
Ziehen'sche Vergoldung 132.
Zunge des lebenden Frosches 3.

WELLCOME LIBRARY INSTITUTE

Lippert & Co. (G. Pätz'sche Buchdr.), Naumburg a. S.